



HAL
open science

Efficacité et évolution de la réponse lymphocytaire T CD8 au cours de l'infection par VIH-1

Eoghann White

► **To cite this version:**

Eoghann White. Efficacité et évolution de la réponse lymphocytaire T CD8 au cours de l'infection par VIH-1. Biologie moléculaire. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT: 2022SORUS471 . tel-04121594

HAL Id: tel-04121594

<https://theses.hal.science/tel-04121594>

Submitted on 8 Jun 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**SORBONNE
UNIVERSITÉ**



Sorbonne Université

ED394 – Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Laboratoire ImmunoConcept

Efficacité et Évolution de la réponse lymphocytaire T CD8 dans le contexte de l'infection à VIH-1.

Par Eoghann White

Thèse de doctorat d'Immunologie

Dirigée par le Docteur Victor Appay

Présentée et soutenue publiquement le 07/12/2022

Devant un jury composé de :

Pr Stéphanie Graff-Dubois

Pr Pierre Delobel

Dr Christine Bourgeois

Dr Asier Saez-Cirion

Dr Pierre Milpied

Dr Julie Dechanet-Merville

Dr Victor Appay

Présidente du jury

Rapporteur

Rapportrice

Examineur

Examineur

Examinatrice

Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je tiens à remercier chacun des membres du jury, **Christine Bourgeois**, **Pierre Delobel**, **Stéphanie Graff-Dubois**, **Asier Saez-Cirion**, **Pierre Milpied** et **Julie Déchanet-Merville** d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Bien entendu un énorme merci à **Victor Appay**. Merci pour ton encadrement pendant ces quatre ans de thèse et ces dernières semaines TRÈS intenses. Je ne suis toujours pas sûr de comprendre pourquoi tu as sélectionné mon CV (le CV était aussi vide que ma photo était moche) mais je t'en suis infiniment reconnaissant. J'ai beaucoup changé depuis le début de cette thèse en 2018, aussi bien scientifiquement qu'humainement, et je te dois beaucoup pour les deux. Merci aussi pour ta patience incroyable avec un doctorant KO sur le gène de l'organisation. *Arigatô gozaimasu* (je fais confiance à google trad sur ce coup).

Merci énormément à **Laura Papagno**. Tu es la première personne à m'avoir encadré et aidé quand je suis arrivé au labo il y a 4 ans. Depuis c'est toujours le même plaisir d'échanger avec toi, que ce soit pour le travail ou juste pour parler de la vie de tous les jours. Alors merci pour ta bonne humeur communicative, pour les discussions et les rires et aussi pour ta sonnerie de téléphone (j'adore *undisclosed desires*). *Molte grazie* (toujours google trad oui oui).

Un gros merci à **Mariela CABRAAAAAAAAAAAL piccin**. On a commencé dans le labo en même temps et j'aurais adoré que tu puisses être là pour ma soutenance (bon après le Brésil c'est sympa donc je comprends). Tu étais un rayon de soleil au laboratoire et tu manques à tout le monde ici, y compris moi. Alors merci pour tout, sauf pour les glaçons dans le dos. *Obrigado*.

Merci également à tous les membres de l'équipe Appay version Paris. En particulier **Delphine Sauce** pour ta bonne humeur et ton rire très communicatif. Tu as accepté de me garder sur Paris pendant que j'étais SLF (sans labo fixe). En gage de reconnaissance, je m'engage à faire don de mon col du fémur en cas de fracture. Normalement c'est le moment où je fais une blague sur ton âge mais j'ai muri... C'est faux ! Merci la vieille <3.

Merci à **Hélène Vallet**, un peu pour la science mais surtout pour nos discussions jusqu'à tard autour d'une (ou quatre) bonne bière de l'intermède.

Merci à **Manon Chauvin** et **Chrystel Marton** d'être les meilleures. Vous avez embelli mes journées avec vos bêtises. Écouter Chrystel raconter qu'elle mange des c...lowns le matin, se faire proposer des sceaux d'eau ou passer le *NOOT NOOT* en boucle ça vous change un homme.

Merci du fond du cœur aux membres du CIMI avec qui j'ai eu le plaisir de travailler pendant les trois premières années de ma thèse. Merci à **Rémy** de continuellement parler de caca (il travaille sur le microbiote) et d'être le vrai leader des soirées du jeudi soir (déso **Mathias**). Merci à **Lisa** pour nos milliers de conversations sur tout et surtout sur n'importe quoi, à **Clémence** d'être so FRESH, à **Marie Lavirion** (toujours aussi drôle cette blague), à **Djelika**, **Marylou**, **Loïse**, **Morgane**, **Chloé**, **Manon**, **Nicolas** et tous les autres membres du CIMI. *Vous me manquez les copainings.*

Je remercie également l'ensemble du laboratoire ImmunoConcept. En particulier les membres de l'équipe Déchanet-Appay parce qu'on fait des sorties vélo sous 58°C et ça, ça n'a pas de prix. Merci également à **Selma**, **Gab**, **Seb**, **Coline**, **Noémie**, **Hannah** et **Florent** qui partagent mon bureau (promis je vais arrêter de taper du pied). Merci aussi à toutes les autres personnes qui font vivre le labo. À **Gaëlle** pour ton rire absolument incroyable, **Iris** et son alter ego Inès, **Aurélia** (elle est à moi cherche pas), **Daniil**, **Anaïs**, **Juliette**, **Pauline**, **Pauline**, **Pauline**, **Titia**, **Dorothee**, **Nathalie**, **Andréa**, **Aurélie**, **Samira**, **Isabelle** et tous les autres que je ne peux pas citer sans écrire 15 pages supplémentaires de remerciements.

Merci également à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce projet. **Patricia** and **Marie-Aline** pour votre aide précieuse et votre bonne humeur à toute épreuve. **Rodolphe** et **Boris** pour les conseils et vos commentaires sur mon travail. **Daniel Douek** pour m'avoir accueilli dans son laboratoire pendant quasiment deux mois.

À **Melvin** parce qu'on se suit depuis notre licence et qu'on s'apprête à finir notre thèse en même temps. On a fait du chemin depuis cette première soirée FIFA (à jamais dans la légende). D'ailleurs tu feras attention t'as un trou dans ton pantalon. À **Quentin**, l'homme le plus beau du Poitou-Charentes (non). À **Valentin** pour avoir partagé la souffrance de la thèse

avec moi et m'avoir initié au ukulélé. À **Robin** pour nos soirées tardives. Un petit Isaac ? À **Clément** le petit lézard. À **Poupou** le plus beau des Poupous.

À **Anthony**, **Solène** et **Bianca** parce que vous êtes beaucoup trop mignon tous les trois. À **Donovan** et **Florian** ~~parce que vous êtes aussi mignons tous les deux~~ pour tous les souvenirs passés et ceux à venir.

À ma famille, la meilleure de toute. Merci à ma **maman** d'avoir tout fait pour nous. À ma **grand-mère** d'être incroyable (en plus d'avoir intégralement corrigé et compris ce manuscrit). À mon **grand-père** d'être l'exemple que j'essaie de suivre. À mes deux petites sœurs **Meghann** et **Robyn** qui, même si l'une est plus moche que l'autre (à vous de choisir les filles), font partie des personnes les plus passionnées et les plus fortes que je connaisse. A mon oncle et ma tante, les fameux **Tintin Lolo** et **Tatie kaï**. A mes deux cousines sauvages **Taylor** et **Éléonore**. À **Tata**, **Tonton** et **Jean-Raymond**. À **Daddy** qui compte énormément. Et bien sûr à **Sam** pour ton amitié vieille de 20 ans alors que j'en ai 28 aujourd'hui.

Enfin à toi **Éloïse**. Merci d'avoir été là pendant l'écriture et d'avoir rendu tout beaucoup plus facile. Merci de m'avoir fait rire avec ce gros crado de Michel (petit ange parti trop tôt), de m'avoir permis de manger autre chose que des pâtes pesto, d'avoir corrigé mes fautes (différenciation avec un c, c'est noté) mais surtout de m'avoir soutenu quand j'étais persuadé de ne pas y arriver. Tu es l'une des raisons qui fait que je me sens si bien à Bordeaux.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS	9
LISTE DES FIGURES	13
LISTE DES ANNEXES	15
CHAPITRE I : INTRODUCTION	17
PARTIE 1 : LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE	19
1.1. ÉPIDEMIOLOGIE DE L'INFECTION A VIH	19
1.2. ORIGINE DU VIH	19
1.3. LA DIVERSITE DU VIH	20
1.4. ORGANISATION DU VIRION ET DU GENOME VIRAL	21
1.5. PATHOGENESE DE L'INFECTION A VIH	23
PRIMO-INFECTION	23
PHASE CHRONIQUE ET SIDA	25
1.6. CYCLE DE REPLICATION DU VIH	27
ATTACHEMENT ET ENTREE DU VIRUS	27
LA TRANSCRIPTION INVERSE	28
L'INTEGRATION DU GENOME VIRAL	30
DE LA REPLICATION JUSQU'A LA MATURATION	30
1.7. LE RESERVOIR	32
TYPES CELLULAIRES IMPLIQUES DANS L'ETABLISSEMENT DE LA LATENCE	32
LES MECANISMES D'INDUCTION DE LA LATENCE	34
DYNAMIQUE D'ETABLISSEMENT DU RESERVOIR	35
PARTIE 2 : STRATEGIES THERAPEUTIQUES ET CONTROLE DE L'INFECTION	37
2.1. ANTIRETROVIRAUX ET CIBLES VIRALES	37
LES INHIBITEURS D'ENTREE	37
LES INHIBITEURS DE LA TRANSCRIPTASE INVERSE	38
LES INHIBITEURS DE L'INTEGRASE	38
LES INHIBITEURS DE LA PROTEASE	39
2.2. LES PROBLEMATIQUES DU VACCIN CONTRE VIH	39
2.3. LA GUERISON FONCTIONNELLE	40
LA STRATEGIE DU « SHOCK AND KILL »	42

LA STRATEGIE DU « BLOCK AND LOCK »	44
2.4. LE CONTROLE EFFICACE DE L'INFECTION	45
LES INDIVIDUS ASYMPTOMATIQUES A LONG TERME	45
LES CONTROLEURS POST-TRAITEMENT	46
2.5. CORRELATS DE CONTROLE DE L'INFECTION A VIH	47
LES FACTEURS GENETIQUES	47
LES FACTEURS DE RESTRICTIONS	49
LA REPOSE INNEE	49
LA REPOSE NON CONVENTIONNELLE	51
LA REPOSE HUMORALE	53
LA REPOSE CELLULAIRE	54
PARTIE 3 : LES LYMPHOCYTES T CD8	57
3.1. LA THYMOPOIESE	57
3.2. LE RECEPTEUR DES CELLULES T	60
LA RECOMBINAISON VDJ	61
LA DIVERSITE DU TCR	63
LE COMPLEXE TCR	64
AFFINITE, AVIDITE ET AVIDITE FONCTIONNELLE	65
3.3. ACTIVATION DES LT CD8	66
FORMATION DE LA SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE	67
LES SIGNAUX 1, 2 ET 3	68
LA SIGNALISATION DU TCR POST ACTIVATION	70
3.4. PROLIFERATION DES LT CD8	72
3.5. FONCTIONS EFFECTRICES	73
LA CYTOTOXICITE	73
PRODUCTION DE CYTOKINES ET CHEMOKINES	74
3.6. LA DIFFERENCIATION DES LT CD8	77
LES SOUS-POPULATIONS EFFECTRICES ET MEMOIRES	77
MARQUEURS PHENOTYPIQUES DES SOUS-POPULATIONS CD8	79
LES MODELES DE DIFFERENCIATION	81
3.7. LA REPOSE LT CD8 DANS L'INFECTION A VIH-1	83
CYTOTOXICITE	83
POLYFONCTIONNALITE	84
PROLIFERATION, SURVIE ET STEMNESS	85
LE ROLE DU TCR	86

3.8. IMPACT DU TRAITEMENT SUR LES ALTERATIONS DES LT CD8	87
LES LT CD8 GLOBAUX	87
LES LT CD8 SPECIFIQUES DU VIH	89
3.9. IMPACT DU VIEILLISSEMENT SUR LES LT CD8	91
RÉSUMÉ ET OBJECTIF DE THÈSE	95
CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES	99
CARACTERISTIQUES DE LA COHORTE IMMUNOCO	101
CARACTERISATION PHENOTYPIQUE	102
TETRAMERES	104
MESURE DE LA TAILLE DES TELOMERES	105
SCRNASEQ	110
TRAITEMENT DES DONNEES DE SCRNASEQ	117
ANALYSE CLONOTYPIQUE	119
AMPLIFICATION ET SEQUENÇAGE SANGER DE GAG ET NEF	120
PROTOCOLE DU BOOSTING	123
ANALYSES STATISTIQUES ET PACKAGES R/BASH UTILISES	125
CHAPITRE III : RÉSULTATS	127
RECONSTITUTION IMMUNITAIRE DES INDIVIDUS DE LA COHORTE IMMUNOCO	129
VIEILLISSEMENT IMMUNITAIRE DES INDIVIDUS DE LA COHORTE IMMUNOCO	134
CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DE LA REPONSE LT CD8 SPECIFIQUE DU VIRUS	137
CARACTERISATION TRANSCRIPTOMIQUE DE LA REPONSE LT CD8 SPECIFIQUE DU VIRUS	140
CARACTERISATION CLONOTYPIQUE DE LA REPONSE LT CD8 SPECIFIQUE DU VIRUS	150
ANALYSE COMPARATIVE DES VIEUX ET NOUVEAUX CLONES	155
EXPANSION <i>IN VITRO</i> DES LT CD8 SPECIFIQUES DU VIRUS DE PATIENTS TRAITES OU NON TRAITES	158
CHAPITRE IV : DISCUSSION	165
CONCLUSION	177
REFERENCES	181
ANNEXES	217
LISTE DE PUBLICATIONS SOUMISES	229
ARTICLE	231

Liste des abréviations

ADCC Antibody Dependent Cell Mediated Cytotoxicity
AGM : African Green Monkey
APOBEC3 : Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme Catalytic polypeptide-like 3
ARNt : ARN de transfert
ART : Thérapie antirétrovirale
AS : Adultes sains
bNAb : Anticorps neutralisants à large spectre
CA : Capside
cART : Thérapie antirétrovirale combinée
CCL3 : C-C motif Chemokine Ligan 3
CCL4 : C-C motif Chemokine Ligan 4
CCL5 : C-C motif Chemokine Ligan 5
CCR : Récepteur aux chemokines
CCR2 : C-C Chemokine Receptor type 2
CCR5 : C-C Chemokine Receptor type 5 (CD195)
CCR7 : C-C Chemokine Receptor type 7
CD : Cluster de Différenciation
CD62L : L-sélectine
CDC : Center for Disease Control
CDR : Complementarity Determining Region
cGAMP : GMP-AMP cyclique
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMJ : Jonction Cortico Médullaire
CMV : Cytomégalovirus
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène
CRF : Circulating Recombinant Form
CXCR4 : CXC Motif Chemokine Receptor 4 (CD184)
CXCR5 : CXC Motif Chemokine Receptor 5 (CD185)
DC : Cellule Dendritique
DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific ICAM-Grabbing Non-integrin (CD209)
DEG : Gènes Différentiellement Exprimés
DN : Thymocytes Double Négatifs

DNMT : Inhibiteur de méthyltransférase de l'ADN
DP : Thymocytes Double Positifs
EC : Elite Controllers
ESCRT : Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
FACS : Fluorescent Activate Cell Sorting
FDR : False Discovery Rate
GALT : Gut Associated Lymphoid Tissues
gp : Glycoprotéine
GSEA : Gene Set Enrichment Analysis
Gzm : Granzyme
HA : Hémagglutinine
Havcr2 : Hepatitis A Virus Cellular Receptor 2
HDAC : Inhibiteur de l'histone déacétylase
HLA : Human Leukocyte Antigen
HLA-DR : Human Leukocyte Antigen-DR
HMT : Inhibiteur de l'histone méthyltransférase
HPC : Progéniteur Hématopoïétique
HSP90 : Heat Shock Protein 90
HUSH : Human Silencing Hub
ICOS : Inducible costimulator
IFN : Interféron
IN : Intégrase
INNTI : Inhibiteur non nucléosidique
INSTI : Inhibiteur de transfert de brin de l'intégrase
INTI : Inhibiteur nucléosidique
IR : Récepteur d'inhibition
IRIS : Syndrome Inflammatoire de Reconstitution Immune
ITAM : Immune Receptor Tyrosine-based Activation Motif
LAV : Lymphadenopathy Associated Virus
LB : Lymphocyte B
LC : Cellule de Langerhans
LNTP : Long Term Non Progressors
LRA : Agent de Réversion de la Latence
LT : Lymphocyte T

LTR : Long Terminal Repeat
MA : Matrice
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MDDCs : Cellule Dendritique dérivant de monocyte
MPEC : Memory Precursors Cells
MSM : hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes
mTOR : Mechanistic target of Rapamycin
Nab : Anticorps neutralisants
NC : Nucléocapside
NES : Score d'Enrichissement Normalisé
NFkB : Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK : Natural Killer
NPC : Complexe de Pore Nucléaire
PBMC : Cellules Mononuclées du Sang Périphérique
PCA : Analyse en Composante Principale
pCMH-I : Complexe peptide/CMH-I
PD-1 : Programmed Cell Death 1
pDC : Plasmacytoid Dendritic Cell
PFA : Paraformaldéhyde
PIC : Complexe de Pré-Intégration
PKC : Protéine Kinase C
ppt : Région riche en purine
PR : Protéase
Prdm1 : PR domain zinc finger protein 1
PTC : Post Treatment Controllers
QC : Contrôle Qualité
QVD : Q-VD-OPH
RANBP2 : Protéine de liaison RAN 2
RANTES : Regulated upon Activation Normal T Cell Expressed and Presumably Secreted
RE : Réticulum Endoplasmique
RM : Rhesus Macaques
ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène
RSS : Recombination Signal Sequence
RT : Reverse Transcriptase

SCF : Stem Cell Factor
SI : Synapse Immunologique
SIDA : Syndrome de l'Immunodéficience acquise
SIV : Simian Immunodeficiency Virus
SLEC : Short Lived Effector Cells
SMAC : Cluster d'Activation SupraMoléculaire
SNAE : Serious non-AIDS Events
SNC : Système Nerveux Central
SVF : Sérum de veau foetal
Tcf7 : Transcription factor 7
T_{CM} : Central Mémoire
TCR : Récepteur des cellules T
TEC : Cellules Épithéliales Thymiques
T_{EM} : Effecteur Mémoire
T_{FH} : T follicular helper
TLR : Toll-Like Receptor
TNFR : Récepteurs TNF
TNF α : Facteur de Nécrose Tumorale α
Tox : Thymocyte selection associated HMG bOX
TP : Time point
TRA : Chaîne α du TCR
TRB : Chaîne β du TCR
TREC : T-cell Receptor Excision Circle
TRL8L : Ligand de TLR8
T_{RM} : Résident Mémoire
T_{SCM} : Souche Mémoire
T_{TD} : Terminales Différenciées
T_{TM} : Transitionnels Mémoires
UMAP : Uniform Manifold Approximation and Projection
VC : Viremic Controllers
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
VISCONTI : *Viro-Immunological Sustained Control after Treatment Interruption*

Liste des figures

- Figure 1** – Distribution des sous-types de VIH-1 à travers le monde
- Figure 2** – Représentation schématique de l'organisation du virion et du génome viral
- Figure 3** – Évolution naturelle de l'infection à VIH-1
- Figure 4** – Cycle de réplication de VIH-1
- Figure 5** – Étapes clés de la rétrotranscription du génome de VIH-1
- Figure 6** – Assemblage, bourgeonnement et maturation d'un virion de VIH-1
- Figure 7** – Induction de la latence pendant le retour à la quiescence d'une cellule infectée
- Figure 8** – Cas connus de rémission prolongée de l'infection à VIH-1
- Figure 9** – Principe général de la stratégie "shock and kill"
- Figure 10** – Représentation schématique de la sélection thymique
- Figure 11** – Structure du TCR α/β
- Figure 12** – Étapes clés de la recombinaison VDJ
- Figure 13** – Structure du complexe TCR en interaction avec un complexe peptide/CMH-I
- Figure 14** – Paramètres descriptifs du TCR
- Figure 15** – Synapse immunologique
- Figure 16** – Principales voies de signalisation impliquées dans l'activation post-TCR
- Figure 17** – Fonctions effectrices des LT CD8.
- Figure 18** – Génération de cellules effectrices et différenciation progressive en cellules mémoires
- Figure 19** – Associations du phénotype de sous-populations de LT CD8 avec certains attributs fonctionnels
- Figure 20** – Modèle de différenciation des LT CD8
- Figure 21** – Principe du telomere length assay
- Figure 22** – Nombre de LT CD8 tétramères + triés pour chaque condition
- Figure 23** – Amplification de l'ADNc à partir des ARNm
- Figure 24** – Réaction de tagmentation de l'ADNc
- Figure 25** – Nombre de cellules retenues après QC pour chaque condition
- Figure 26** – Analyse de la séquence de l'épitope FL8 chez l'individu PS14 en 2016.
- Figure 27** – Représentation schématique du modèle du Boosting
- Figure 28** – Évolution de la virémie des patients de la cohorte IMMUNOCO
- Figure 29** – Diminution de l'activation immunitaire, restauration des LT CD4 et normalisation du ratio CD4:CD8 chez les individus de la cohorte IMMUNOCO

Figure 30 – Caractérisation des sous-populations mémoires des LT CD8 et LT CD4

Figure 31 – Vieillesse immunitaire des individus de la cohorte IMMUNOCO

Figure 32 – Fréquence des réponses LT CD8 spécifiques du virus au cours du temps

Figure 33 – Caractérisation phénotypique des LT CD8 spécifiques du VIH-1 au cours du temps

Figure 34 – Représentation schématique de la stratégie du scRNAseq

Figure 35 – PCA et visualisation de la distribution du transcriptome des LT CD8 spécifiques du virus pour PS24 et PS03

Figure 36 – Volcano plot des gènes différentiellement exprimés entre EARLY et LATE pour PS24 et PS03

Figure 37 – Violins-plots de gènes clés différentiellement exprimés entre EARLY et LATE pour PS24

Figure 38 – Voies de signalisation associées à EARLY et LATE identifiées par GSEA

Figure 39 – Comparaison du transcriptome des LT CD8 à EARLY et LATE avec la signature d'individus progressseurs et d'EC

Figure 40 – Comparaison du transcriptome de LT CD8 spécifique de VIH-1 et VIH-2

Figure 41 – Évolution de la séquence virale sur les épitopes reconnus par les réponses LT CD8 de PS03 et PS24

Figure 42 – Évolution clonotypique de la réponse B*08-FL8 chez PS24 au cours du temps

Figure 43 – Évolution clonotypique de la réponse B*08-EI8 chez PS24 au cours du temps

Figure 44 – Évolution clonotypique de la réponse B*57-KF11 chez PS03 au cours du temps

Figure 45 – Composition clonotypique de la réponse B*53-TL9 chez deux individus infectés par VIH-2.

Figure 46 – Expression différentielle de CD28 par les vieux et nouveaux clones.

Figure 47 – Détection des gènes associés au nouveau ou vieux clone par sPLS-DA

Figure 48 – Voies de signalisation associée au vieux ou nouveau clone de la réponse B*08-FL8

Figure 49 – Expansion des LT CD8 tétramères + après stimulation

Figure 50 – Expression de GzmB par les LT CD8 tétramères après stimulation

Figure 51 – Expression de perforine par les LT CD8 tétramères après stimulation

Figure 52 – Expression de T-bet par les LT CD8 tétramères après stimulation

Liste des annexes

Annexe 1 – Évolution de la charge virale et du compte LT CD4 au cours du suivi des individus de la cohorte IMMUNOCO

Annexe 2 – Réponse LT CD8 spécifique du virus testée et détectée au sein des individus de la cohorte IMMUNOCO avec un HLA compatible

Annexe 3 – Populations LT CD8 spécifiques du virus triées pour le scRNAseq

Annexe 4 – Analyse transcriptomique de la réponse B*57-KF11 de PS03

Annexe 5 – Séquence du VIH-1 sur les épitopes étudiés au cours du temps

Annexe 6 – Composition clonotypique de la réponse LT CD8 spécifique de FL8 (PS24)

Annexe 7 – Composition clonotypique de la réponse LT CD8 spécifique de EI8 (PS24)

Annexe 8 Composition clonotypique de la réponse LT CD8 spécifique de KF11 (PS03) et spécifique de QK10 (PS14)

Annexe 9 – Composition clonotypique de la réponse LT CD8 spécifique de SL9 (PS212)

Chapitre I :

INTRODUCTION

Partie 1 : Le Virus de l'Immunodéficience Humaine

1.1. Épidémiologie de l'infection à VIH

Le 5 Juin 1981 le *Center for Disease Control* (CDC) américain publie dans l'un de ses journaux quotidiens le cas de 5 individus présentant une pneumonie soudaine à *Pneumocystis carinii* ¹Leurs cas intriguent car c'est une maladie normalement retrouvée chez des individus immunodéprimés et aucun d'entre eux n'avait présenté de signes annonciateurs d'une possible immunodéficience. Il s'agira en réalité de la première observation clinique du syndrome de l'immunodéficience acquise, aujourd'hui connu sous le nom de SIDA. Les mois suivants verront la multiplication de cas similaires ainsi qu'une recrudescence de maladies rares telles que la maladie de Kaposi, souvent associée à une immunodépression. La vitesse à laquelle les nouveaux cas sont détectés exhorte à l'identification de l'agent étiologique responsable de l'épidémie. C'est en 1983 qu'il est enfin découvert par Luc Montagnier et Françoise Barré-Sinoussi lorsqu'ils identifient un rétrovirus dans les ganglions d'un individu atteint de lymphadénopathie généralisée, l'un des symptômes majeurs du SIDA ². Ils nomment alors le virus LAV pour *lymphadenopathy associated virus*. L'appellation sera abandonnée en 1986 au profit de celle que l'on connaît aujourd'hui : Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH). Quasiment 40 ans après sa découverte, l'épidémie à VIH est devenue globale et constitue toujours un problème de santé publique majeur. Pas une seule région du monde n'est épargnée par l'infection. On estime que 84,2 millions de personnes ont été infectées par le virus, coûtant la vie à plus de 40 millions d'entre elles ³. Malgré des progrès thérapeutiques importants qui auront permis de transformer l'infection à VIH en maladie chronique, le virus circule toujours. En 2021, il a été recensé 1,5 million de nouvelles infections et 650 000 décès liés au virus.

1.2. Origine du VIH

En 1986 un deuxième virus responsable du SIDA est identifié en Afrique de l'Ouest. Ce virus est appelé VIH-2 puisqu'il s'agit du deuxième agent étiologique découvert responsable du SIDA. VIH-2 est semblable d'un point de vue morphologique à VIH-1 mais

est caractérisé par une charge virale plus faible, une évolution plus lente vers le stade SIDA et un profil antigénique distinct ⁴. Les origines de VIH-1 et VIH-2 resteront incomprises jusqu'à la découverte de virus simien appelé SIV pour *Simian Immunodeficiency Virus* ⁵⁻⁷. Le SIV est découvert dans un premier temps chez des macaques captifs. La comparaison de ce nouveau virus avec VIH-1 montre des similitudes marquantes. Le SIV se réplique dans les CD4, possède des protéines structurelles de même poids moléculaire que VIH-1 et semble induire une immunodéficience chez son hôte ^{6,7}. Par la suite le SIV est trouvé de manière prévalente dans plusieurs espèces de primates à l'état sauvage. Certaines espèces possèdent un SIV qui leur est propre et les nouvelles souches de SIV découvertes sont nommées d'après l'espèce dans laquelle elles ont été identifiées (SIV_{gor} pour le SIV identifié chez le gorille par exemple). Très vite l'analyse génétique des différentes souches de SIV permet d'identifier l'origine simienne de VIH : VIH-1 est proche d'un SIV retrouvé chez le chimpanzé (SIV_{cpz}) tandis que VIH-2 correspond à un SIV retrouvé chez le singe vert mangabey (SIV_{smm}) ^{8,9}. Ce sont les premiers indices qui montrent que le VIH est une zoonose, une maladie infectieuse passée d'un réservoir animal vers l'Homme.

1.3. La diversité du VIH

En réalité VIH-1 ne correspond pas à un seul virus, mais à plusieurs provenant chacun d'un épisode indépendant de transmission inter-espèces ¹⁰. VIH-1 est divisé en 4 sous-types appelés M (Major), N (non-M, non-O), O (Outlier) et P (Putative). Les virus des groupes N et P sont retrouvés au Cameroun et ont infecté 20 et 3 personnes respectivement à ce jour ¹¹⁻¹³. Les virus du groupe O représentent moins de 1% des infections globales et sévissent principalement au Gabon, Cameroun et dans les pays avoisinants ¹⁰. Les virus du groupe M, qui correspondent à la forme pandémique du VIH, sont actuellement classifiés en neuf sous-groupes (A, B, C, D, F, G, H, J, K) qui divergent entre eux de 15 à 20% dans les gènes Gag et Env respectivement ¹⁴. L'existence de formes recombinantes (CRF) ajoute encore à la diversité du virus puisqu'à ce jour plus de 40 CRF ont été décrites ¹⁴. Le sous-groupe C est responsable de 50% des cas d'infections, principalement en Afrique du Sud, Inde et Chine. Le sous-groupe A est majoritaire en Afrique de l'Est, Europe de l'Est et Asie Centrale tandis que le sous-groupe B est retrouvé principalement en Australie, Amérique du Nord et Europe de l'Ouest (Figure 1) ¹⁵. VIH-2 est divisé en 8 sous-types notés de A à H. A l'instar de VIH-1, chaque sous-type provient d'un épisode indépendant de transmission inter-espèces ¹⁰. Les

sous-types A et B sont responsables de la plupart des cas d'infection tandis que les autres correspondent à des formes de VIH-2 identifiées chez un seul individu et représentent probablement des infections inter-espèces sans propagation ultérieure dans la population humaine ¹⁶. Par souci de simplicité, et sauf mention contraire, chaque mention de VIH dans ce manuscrit fera référence à VIH-1 sous-type M.

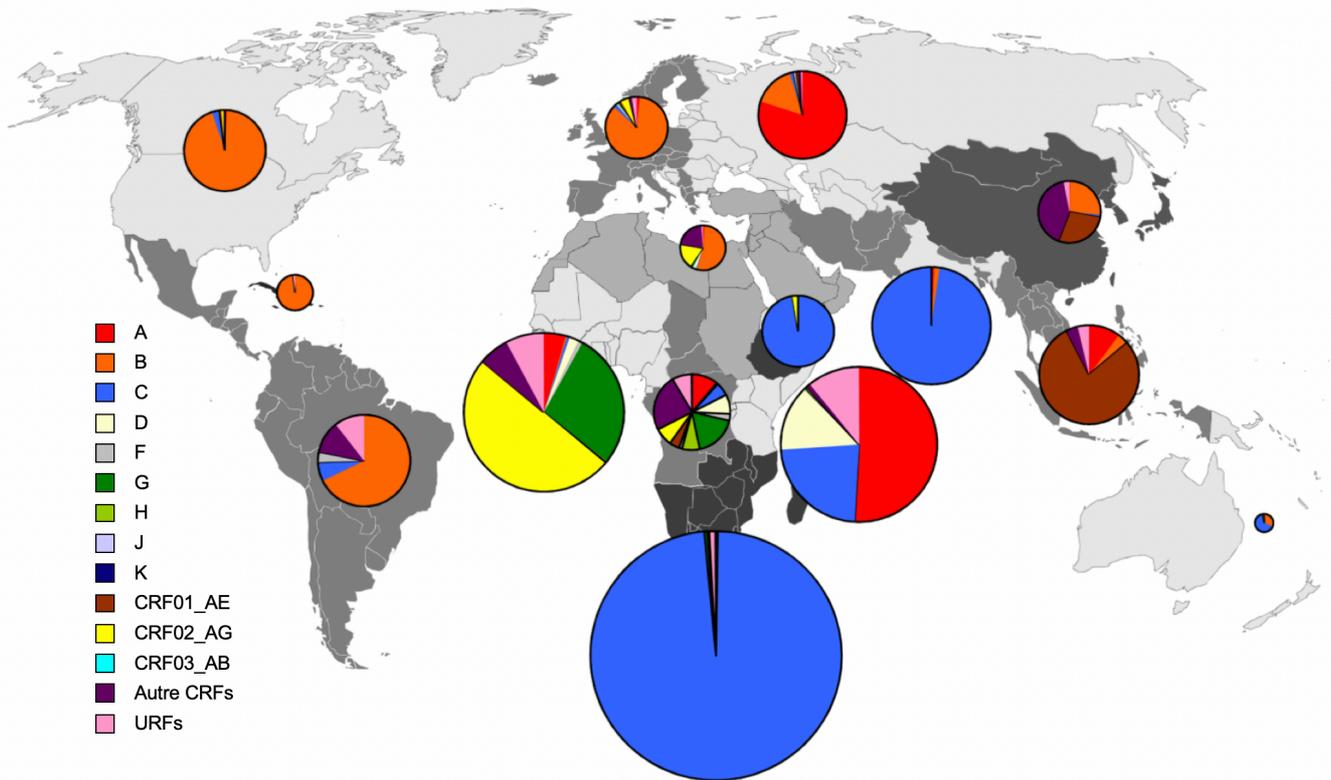


Figure 1 - Distribution des sous-types de VIH-1 à travers le monde. Adapté de Hemelaar et al. 2001 (17). Le monde a été divisé en 15 régions représentées par les zones grisées. Les diagrammes circulaires représentent la distribution des sous-types de VIH-1 et des recombinants dans chaque région entre 2004 et 2007. La surface du diagramme circulaire est proportionnelle au nombre de personnes infectées par le virus vivant dans cette région du monde.

1.4. Organisation du virion et du génome viral

Le comité international de taxonomie des virus place le VIH dans la famille des *Retroviridae* et dans le genre *Lentivirus*. Le virion de VIH est une particule sphérique d'un diamètre de 145 nm ¹⁷. Il est délimité par une enveloppe externe contenant environ 14 exemplaires de la protéine virale Env, nécessaire pour l'attachement du virion à la cellule cible ¹⁸. La protéine matrice (MA, p17) s'associe sous forme de trimère à la surface interne de

l'enveloppe. Vient ensuite la capside virale (CA), constituée d'un assemblage de sous-unités p24, qui contient et protège le génome viral. Le génome de VIH-1 est constitué de deux brins d'ARN de polarité positive, d'une longueur d'environ 9 kb, interagissant avec des molécules de nucléocapside virale (NC) ¹⁹. En plus du génome, on trouve dans la capside les enzymes virales transcriptase inverse (RT) et intégrase (IN) essentielles pour le cycle de réplication. Enfin, le virion contient également l'enzyme protéase (PR) et les protéines virales accessoires Vpr, Nef, Tat, Rev, Vif et Vpu (Figure 2) ¹⁹.

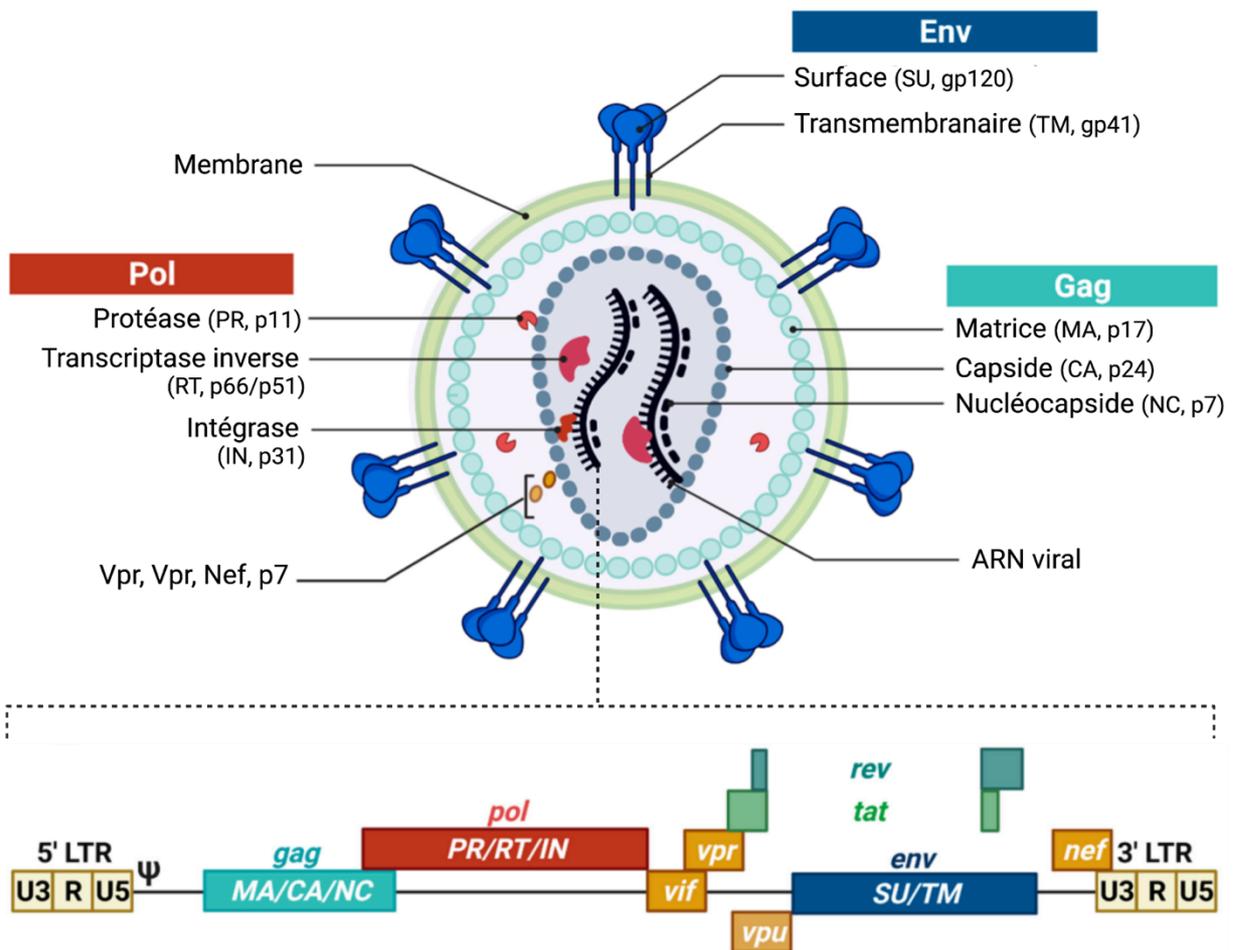


Figure 2 - Représentation schématique de l'organisation du virion et du génome virale. Adapté de van Heuvel et al (19).

Le génome de VIH-1 est composé de 9 gènes codant pour 15 protéines ²⁰. Parmi ces gènes, 3 sont communs à tous les rétrovirus : *gag*, *pol* et *env*. Les gènes *gag* et *env* codent pour les protéines structurales du virion. Le produit de Gag est un précurseur de 55 kDa (appelé en conséquence p55) dont le clivage protéolytique génère les protéines virales matrice

(MA, p17), capsid (CA, p24) et nucléocapsid (NC, p7). Le clivage protéolytique du précurseur gp160 de Env génère les sous-unités gp120 et gp41 qui s'associent en trimères pour former la protéine Env mature. Le clivage des précurseurs de Gag et Env est médié par la protéase virale (PR, p12), elle-même un produit du gène Pol. Le gène Pol code également pour la reverse transcriptase (RT p66/p51) qui permet la synthèse de l'ADN viral et l'intégrase (IN, p32) qui catalyse l'intégration de l'ADN viral dans l'ADN cellulaire ²¹. En plus des gènes communs aux rétrovirus, VIH-1 possède des gènes accessoires jouant un rôle important dans le cycle de réplication virale. Il en existe 6 : *tat*, *rev*, *nef*, *vpr*, *vif* et *vpu*. Ces gènes accessoires modulent le cycle de réplication par deux mécanismes distincts. Ils peuvent faciliter le déroulement de certaines étapes du cycle, c'est notamment le cas de *tat* et *rev* qui facilitent la transcription du provirus. Ils peuvent également interagir avec des facteurs de restrictions cellulaires pour empêcher l'action de ces derniers (Figure 2).

1.5. Pathogenèse de l'infection à VIH

Le virus se transmet principalement par pénétration lors d'un rapport sexuel. Plus de 70 % des cas de transmissions proviennent de rapports hétérosexuels, les 30 % restants sont largement attribuables aux hommes ayant des rapports sexuels avec les hommes (MSM), usagers de drogues injectables et les infections mère-enfant pendant la grossesse ou au moment de l'accouchement ²². Malgré ces multiples modes de transmissions, les événements post-exposition qui mènent à une infection productive sont remarquablement similaires. Après transmission, la pathogenèse de l'infection à VIH est classiquement divisée en 3 étapes : la primo-infection, la phase chronique et la phase SIDA. Il est important de préciser que l'étude des premières étapes de l'infection chez l'Homme est complexe. Pour cause, les biopsies sont rares et les premières étapes de l'infection interviennent en l'absence de symptômes cliniques. Une grande partie de nos connaissances actuelles sur les premières étapes de l'infection proviennent de l'étude du SIV chez le singe.

1.5.1. Primo-infection

La primo-infection débute par une première phase cliniquement asymptomatique appelée phase d'éclipse. Pendant cette période les individus infectés ont une charge virale indétectable et n'ont pas encore de réponse immunitaire dirigée contre le virus, rendant impossible la détection de l'infection ²³. Il s'agit d'une période de 7 à 21 jours pendant

laquelle le virus se réplique activement dans la lamina propria des muqueuses oropharyngées, gastro-intestinales ou génitales en fonction du mode de transmission ²⁴. Le virus y rencontre trois types cellulaires qui vont chacun jouer un rôle dans la propagation de l'infection : les lymphocytes T CD4 (CD4), les cellules dendritiques (DCs) et les cellules de Langerhans (LCs). La population CD4 des muqueuses est quasi exclusivement composée de cellules CD4 CCR5⁺, une population peu fréquente dans le sang mais qui compose la quasi-totalité des populations CD4 des muqueuses intestinales, respiratoires et génitales ²⁵⁻²⁷. Ces cellules constituent une cible privilégiée pour le virus et soutiennent la majorité de la réplication virale dans les premiers jours de l'infection. A l'inverse, bien que les DCs soient susceptibles à la réplication virale, la réplication est généralement moins productive que dans les CD4 ²⁸. Les DCs peuvent toutefois potentialiser l'infection en internalisant des virions via le récepteur DC-SIGN (CD209) et en interagissant avec les CD4 CCR5⁺ environnants. C'est le phénomène de trans-infection ²⁸. Enfin, les LCs facilitent la propagation de l'infection. Après avoir été infectés les LCs peuvent migrer via le système lymphatique vers les organes lymphatiques (notamment les ganglions lymphatiques). Une fois sur place les virions qu'ils transportent infectent les CD4 CCR5⁺ sur site, permettant une généralisation de l'infection ²⁹.

La phase d'éclipse est suivie par la primo-infection (ou phase aiguë de l'infection) qui commence lorsque le virus se propage via le système lymphatique et que la réplication virale converge vers le GALT (*Gut Associated Lymphoid Tissues*) ^{30,31}. Le GALT est un organe lymphoïde majeur contenant environ 60 % des cellules T du corps ³². A l'instar des muqueuses, le GALT est composé d'une majorité de CD4 CCR5⁺. Ces cellules expriment CD69 et HLA-DR, synonymes d'un état d'activation du fait de l'environnement du GALT, riche en cytokines inflammatoires. L'activation étant un prérequis important pour la réplication des lentivirus, les CD4 CCR5⁺ du GALT constituent une cible parfaite pour l'infection ^{33,34}. La réplication virale dans le GALT est intense et la charge virale peut atteindre 10⁷ copies d'ARN viral par mm³ de sang ²³. L'augmentation de la virémie coïncide avec une chute du nombre de CD4 dans le GALT et dans le sang périphérique. A ce stade la demi-vie moyenne d'une CD4 mémoire infectée est moins d'une journée ³⁵. On estime que 80 % des CD4 contenus dans le GALT sont déplétées pendant les 3 premières semaines de l'infection (20 % à cause de l'effet cytopathique du VIH et les 60% restants par apoptose induite par activation) ^{36,37}. La réplication intense du virus est accompagnée par l'apparition des premiers symptômes cliniques. Ils sont décrits comme étant ceux d'une grippe (fièvre, maux de tête, toux, douleurs musculaires, etc.), durent entre 2 et 4 semaines et passent très

souvent inaperçus en l'absence d'une suspicion clinique ^{38,39}. L'apparition d'une réponse immunitaire coïncide avec le moment où la virémie atteint son pic. Elle est composée d'anticorps dirigés contre les protéines virales mais surtout d'une réponse lymphocytaire T CD8 (CD8) visant spécifiquement les cellules infectées par le virus. La pression immunitaire exercée par les CD8 conduit à une diminution progressive de la charge virale d'un facteur 10 à 200 en fonction des estimations ⁴⁰⁻⁴². On observe pendant cette diminution l'apparition de mutations d'échappement destinées à échapper à la réponse CD8 ^{43,44}. En parallèle la diminution de la charge virale est accompagnée d'un rebond du nombre de CD4 dans le sang périphérique, mais pas dans le GALT ³⁶. Entre 3 et 6 mois après le début de l'infection, la charge virale atteint son point d'équilibre (*viral set point*). Il s'agit d'un indicateur important de l'évolution de la maladie puisque le point d'équilibre est partiellement prédictif de la vitesse à laquelle la maladie va progresser et du risque de transmission du virus ³⁶. On entre alors dans la phase chronique de l'infection.

1.5.2. Phase chronique et SIDA

La phase chronique est la phase la plus longue de l'infection, pouvant durer entre 1 et 20 ans, sans aucun symptôme ²³. Pendant la phase chronique il existe un équilibre entre le virus et le système immunitaire. Le virus mute continuellement pour échapper aux réponses cellulaires (principalement médiées par les CD8) et humorales, et le système immunitaire génère des nouvelles réponses capables de reconnaître les mutants d'échappement et de partiellement contrôler la charge virale. La phase chronique de l'infection à VIH-1 est caractérisée par une activation globale et constante du système immunitaire ⁴⁵. Pendant l'infection chronique le virus continue de se répliquer activement dans les organes lymphoïdes, notamment dans le GALT. La destruction massive des CD4 CCR5⁺ du GALT fragilise la barrière intestinale et facilite la translocation de produits microbiens vers le compartiment sanguin ³¹. Ce phénomène, associé à la réplication virale constante, est à l'origine d'une activation globale du système immunitaire. Celle-ci est traduite par l'expression de marqueurs d'activation (CD38 et HLADR sur les CD8 et les CD4), l'accumulation de monocytes CD14⁺ CD16⁺ pro-inflammatoires et la synthèse de cytokines pro-inflammatoires ^{46,47}. L'importance de l'activation immunitaire dans la pathogenèse de VIH-1 est soulignée par le fait que la progression vers le stade SIDA corrèle avec l'expression de marqueurs d'activation ⁴⁶. D'ailleurs, l'expression de marqueurs d'activation sur les CD8 corrèle mieux avec la progression de la maladie que la charge virale ou le nombre de CD4

^{48,49}. Ainsi, la destruction des CD4 est provoquée à la fois par l'effet cytopathique de la réplication virale mais également par la sur-activation immunitaire qui favorise l'apoptose des CD4 infectées et des CD4 non-infectées environnantes ⁵⁰.

En plus de détruire les CD4, et donc d'amputer le système immunitaire d'un de ses éléments majeurs, l'activation induite par le virus est à l'origine d'altérations qualitatives et quantitatives d'autres sous-populations immunitaires (notamment les CD8, B, NK, monocytes, pDC, etc.) ⁵¹. Ces altérations sont associées à un déclin progressif de l'immunocompétence conduisant à terme à une immunodéficience majeure, caractéristique de la phase SIDA. Il est admis que la phase SIDA commence lorsque le compte CD4 tombe en dessous de 200 cellules/mm³ de sang (Figure 3). On observe alors une augmentation de la charge virale et une recrudescence de maladies et d'infections opportunistes. En l'absence de traitement l'infection à VIH-1 est l'une des maladies infectieuses les plus létales, avec un taux de mortalité supérieur à 95% ²³.

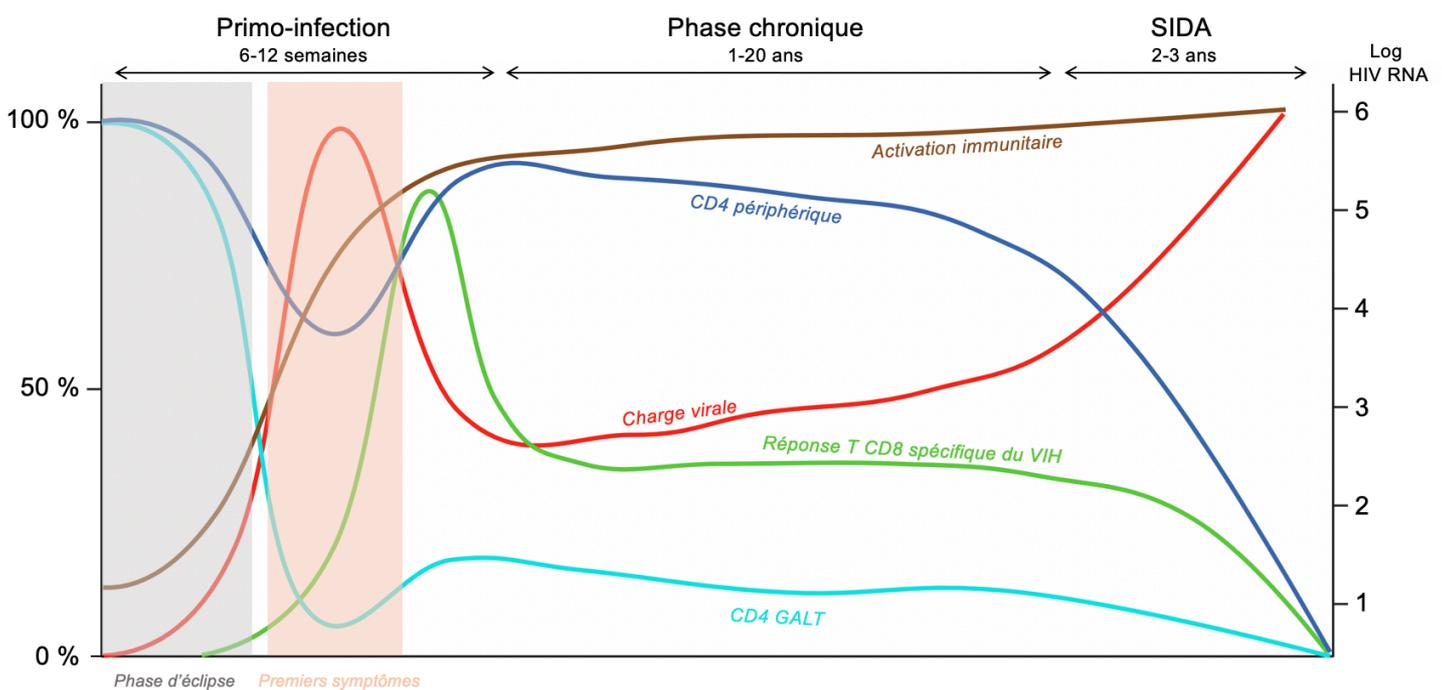


Figure 3 – Évolution naturelle de l'infection à VIH-1. Adapté de Grossman et al (52). Pendant la primo-infection la réplication virale est associée à une diminution significative des LT CD4 du GALT et une diminution modeste des LT CD4 périphériques. L'induction de réponses LT CD8 spécifiques du virus permet de partiellement contrôler la charge virale qui atteint alors un point d'équilibre, c'est le début de la phase chronique. L'activation immunitaire persistante pendant cette phase est à l'origine d'altérations qualitatives de la plupart des compartiments immunitaires et induit une immunodéficience progressive. A terme on entre dans la phase SIDA marquée par une immunodéficience majeure, l'apparition de maladies opportunistes et le décès de l'individu infecté au bout de quelques mois/années.

1.6. Cycle de réplication du VIH

Le cycle de réplication du VIH est séparé en 8 étapes importantes. On trouve dans l'ordre : l'attachement, la fusion, la reverse transcription, l'intégration, la réplication, l'assemblage, le bourgeonnement et la maturation (Figure 4).

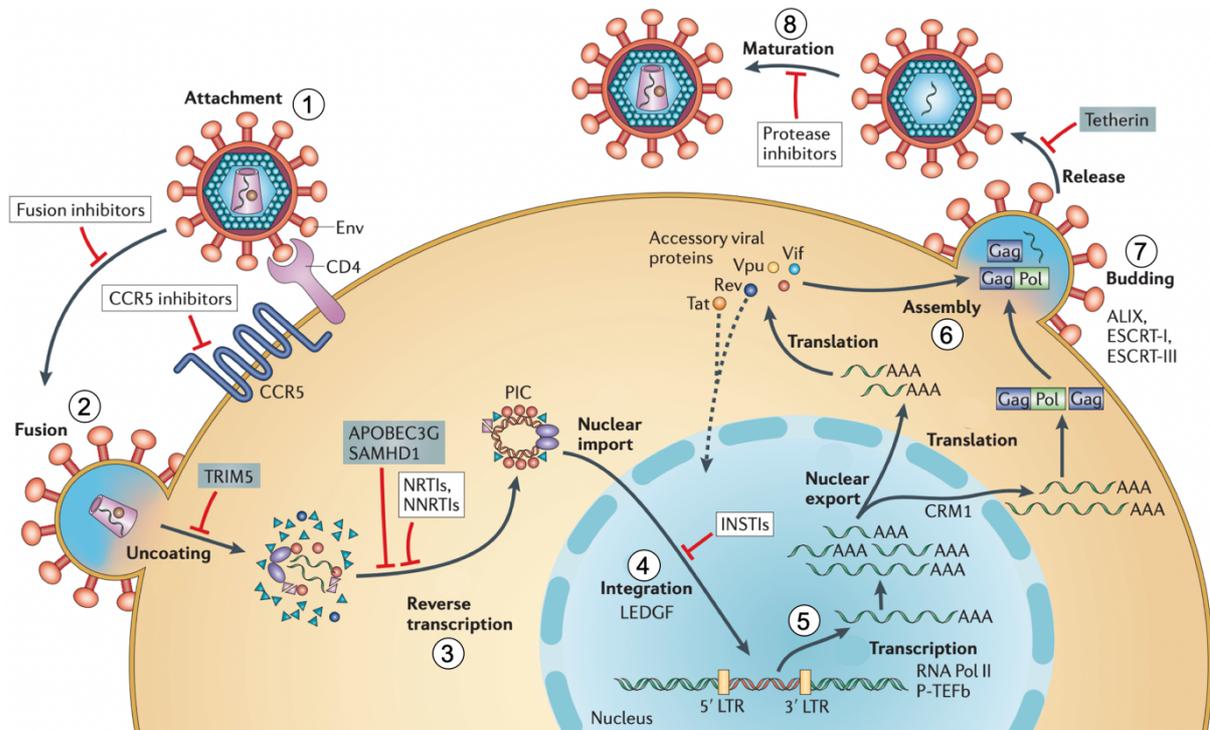


Figure 4 - Cycle de réplication de VIH-1. Butler et al (61). La première étape du cycle est l'attachement du virion à la cellule cible (Étape 1). L'attachement nécessite une interaction entre la protéine virale Env et les récepteurs cellulaires CD4 et CCR5/CXCR4. Une fois attaché, la membrane du virion fusionne avec celle de la cellule cible permettant de libérer le génome viral dans le cytoplasme (Étape 2). La libération du génome permet l'initiation de la rétrotranscription (Étape 3). L'ADNc viral formé est alors inclus dans un complexe de pré-intégration (PIC) pour permettre son importation dans le noyau. Une fois importé, l'ADNc viral est intégré au sein du génome cellulaire (Étape 4), induisant la formation d'un provirus. Le provirus est ensuite transcrit par la machinerie cellulaire (Étape 5). Les transcrits sont transportés vers le cytoplasme afin d'être traduits en protéines virales. Les protéines virales nouvellement créées sont assemblées à la membrane (Étape 6) permettant la formation d'un virion immature libéré par bourgeonnement (Étape 7). La protéase virale clive les précurseurs protéiques viraux permettant de libérer les protéines virales matures et de former un virion mature (Étape 8).

1.6.1. Attachement et entrée du virus

Le facteur viral Env permet l'attachement du virion à la cellule cible en interagissant avec des facteurs d'attachement présents à sa surface, notamment l'héparane sulfate ⁵² l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ ⁵³ ou encore DC-SIGN ⁵⁴. Ces facteurs d'attachement jouent un rôle

important mais ne sont pas essentiels pour une infection productive. Il est aujourd'hui accepté qu'ils permettent de rapprocher Env de sa véritable cible : le récepteur CD4⁵⁵⁻⁵⁷. Une fois Env dans la proximité immédiate du récepteur CD4 il interagit avec ce dernier au travers de la sous-unité gp120. Cette interaction provoque un changement de conformation de gp120 libérant un site de fixation pour le co-récepteur CCR5 ou CXCR4 en fonction du tropisme du virus. L'assemblage d'un complexe CD4/gp120/corécepteur provoque un changement de conformation permettant de libérer les protéines de fusion de gp41. Ces dernières s'insèrent dans la membrane ce qui permet de fusionner les membranes plasmiques du virion et de la cellule cible⁵⁸⁻⁶⁰. La fusion des membranes cellulaires libère la capsid virale dans le cytoplasme de la cellule cible et permet l'initiation de la transcription inverse.

1.6.2. La transcription inverse

La transcription inverse est initiée rapidement après l'entrée du virion dans la cellule cible. Il est en effet possible de détecter de l'ADN viral quelques heures après l'infection⁶¹. Le processus de la transcription inverse repose sur deux activités de la transcriptase inverse (RT) virale : (a) une activité ADN polymérase qui permet de synthétiser un brin d'ADN à partir d'un brin complémentaire d'ADN ou d'ARN et (b) une activité ribonucléase H qui hydrolyse l'ARN uniquement contenu dans un double brin hybride ADN/ARN. La RT utilise l'ARN de transfert (ARNt) Lys3 de l'hôte comme amorce pour initier la synthèse du brin d'ADN (-) à partir de l'ARN viral (Figure 5 – Étape A). Cela génère un duplex ARN/ADN, dont l'ARN est dégradé par l'activité ribonucléase H de la RT (Étape B). L'ADN synthétisé est alors transféré vers l'extrémité 3' de l'ARN viral (car les extrémités 3' et 5' sont similaires) et sert d'amorce pour finaliser l'élongation du brin d'ADN (-) (Étape C). Au fur et à mesure que l'ADN (-) est synthétisé, l'ARN en duplex ARN/ADN est dégradé par l'activité ribonucléase H, à l'exception d'une région riche en purine (ppt) situé au milieu de l'ARN viral (Étape D).

Cette séquence sert d'amorce pour initier l'élongation du second brin d'ADN (+). Pour la synthèse du brin ADN (+), la RT copie l'ADN (-) mais également les 18 premiers nucléotides de Lys3 (Étape E). Une fois l'ARNt copié en ADN il devient un substrat pour l'activité ribonucléase H qui le dégrade à l'exception d'un nucléotide A sur l'extrémité du brin 3' de l'ADN (-). Les 18 nucléotides de Lys3 copiés sur le brin d'ADN (+) sont complémentaires des 18 premiers nucléotides de l'extrémité 5' du brin d'ADN (-) (Étape F).

Ces deux extrémités s'hybrident et la RT peut alors finaliser l'élongation des brins d'ADN (-) et (+) (Étape G) ⁶². Le produit final est un ADN qui contient à ses deux extrémités la même séquence composée des deux extrémités de l'ARN viral (U3-R-U5). Ces séquences sont appelées « long terminal repeats » (LTRs) et sont nécessaires pour l'étape suivante : l'intégration.

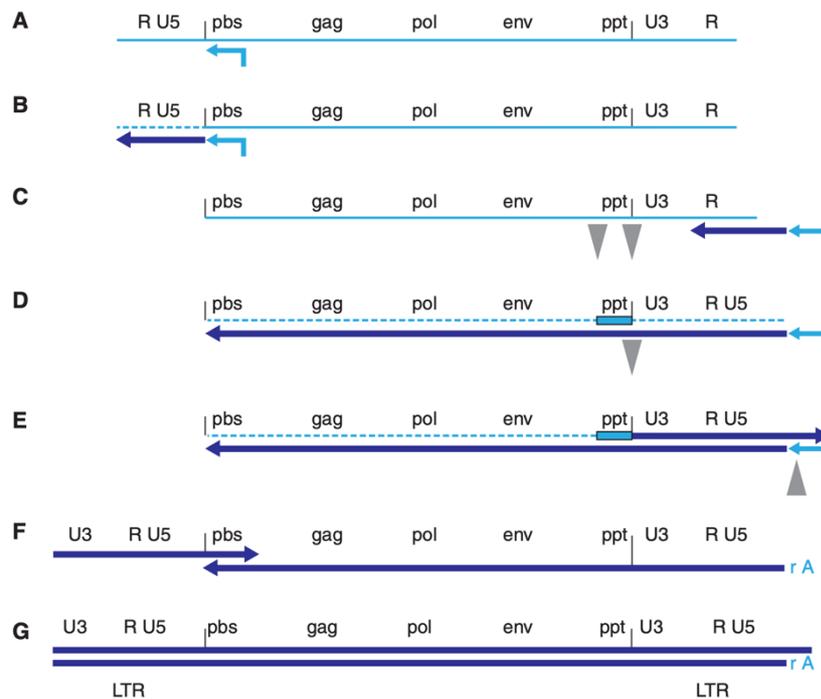


Figure 5 – Étapes clés de la rétrotranscription du génome de VIH-1. Wei-Shau Hu & Stephen H.Hughes (62) Étape A- Initiation de la synthèse du brin d'ADN- à partir de l'ARNt cellulaire Lys3 (flèche bleu clair). Étape B – L'ARN (pointillés bleu clair) du duplex d'ADN/ARN généré par l'élongation à partir de Lys3 est dégradé grâce à l'activité ribonucléase H de la RT. Étape C – L'ADN libéré après dégradation de l'ARN est alors transféré vers l'extrémité 3' de l'ARN et sert d'amorce pour finaliser l'élongation du brin d'ADN (flèche bleu foncé). Étape D – Au fur et à mesure de l'élongation l'ARN en duplexe ADN/ARN est dégradé par l'activité ribonucléase H de la RT (pointillés bleu clair) à l'exception d'une région riche en purine ppt (rectangle bleu clair). Étape E – La région ppt sert d'amorce pour l'élongation du brin d'ADN+. La RT copie également les 18 premiers nucléotides de l'ARN de transfert Lys3 (flèche bleu clair). Étape F – L'activité ribonucléase H de la RT permet la dégradation de l'ARNt Lys3 impliqué dans un duplex ARN/ADN. La complémentarité des régions 5' du brin d'ADN- et de 3' de l'ADN + permet un transfert de brin. Étape G – La RT peut alors finaliser l'élongation des brins d'ADN – et +.

1.6.3. L'intégration du génome viral

La première étape de l'intégration est la formation d'un complexe de pré-intégration (PIC) contenant l'ADN viral, l'intégrase virale, des protéines de la capsid ainsi que des protéines cellulaires. L'ensemble du PIC excède largement la taille maximale pour une translocation passive vers le noyau. C'est pourquoi il est admis que le PIC accède au noyau de la cellule infectée par un mécanisme actif faisant intervenir des facteurs viraux et des facteurs cellulaires. Parmi les facteurs viraux la capsid joue un rôle important. De par son interaction avec des facteurs d'attachement cellulaire (RANBP2, NUP153, Cyclophilin A), elle permet l'attachement du virion à la partie cytoplasmique du complexe de pores nucléaires (NPC) puis l'importation dans le noyau ⁶³. Une fois dans le noyau l'intégrase se tétramérise au sein du PIC et interagit avec l'ADN viral via les LTRs pour former un complexe appelé « intasome » ^{21,64}. L'intasome se fixe sur l'ADN génomique et catalyse l'insertion de l'ADN viral en deux étapes : le 3' processing et le transfert de brin. L'étape de 3' processing consiste à enlever un dinucléotide GT à chaque extrémité 3' de l'ADN viral. Cela génère des extrémités 3'OH réactives qui permettent à l'intégrase de catalyser une attaque nucléophile sur l'ADN génomique, c'est l'étape de transfert de brin ⁶⁵. Il se forme alors une liaison covalente entre l'extrémité 3'OH réactive de l'ADN viral et l'extrémité 5' phosphate de l'ADN génomique ⁶⁶. Le produit de la réaction est un provirus intégré dont les régions LTRs constituent le début et la fin.

1.6.4. De la réplication jusqu'à la maturation

Une fois intégré il existe deux devenir pour le provirus : (a) l'extinction transcriptionnelle du provirus, cela mène à l'établissement d'une infection latente qui constitue l'obstacle majeur au développement d'une stratégie curative de l'infection à VIH, ou (b) la transcription active du provirus, ou « réplication », permettant la synthèse de protéines virales nécessaires pour la production de nouveaux virions. La transcription du provirus dépend de facteurs de transcription cellulaire (NFkB, Sp1 et TBP par exemple) et de facteurs viraux (Tat et Vpr). L'ARN polymérase II se sert de la région 5'LTR du provirus comme promoteur pour initier la transcription du génome viral. L'ARN viral transcrit est alors exporté vers le cytoplasme où il est traduit pour former les protéines virales nécessaires à l'assemblage du virion. Les polyprotéines Gag et Gag-Pol se multimérisent tout en migrant vers le site d'assemblage au niveau de la membrane plasmique. En parallèle la glycoprotéine Env est exprimée à la surface

de la cellule infectée via les vésicules sécrétoires du réticulum endoplasmique (RE). Après incorporation de l'ARN viral, la machinerie ESCRT est recrutée pour permettre le bourgeonnement et la libération du virion nouvellement formé ⁶⁷. Le virion libéré est une particule virale immature. Le clivage protéolytique des polyprotéines Gag et Gag-Pol par la protéase virale permet la formation de la capside et la maturation du virion (Figure 6).

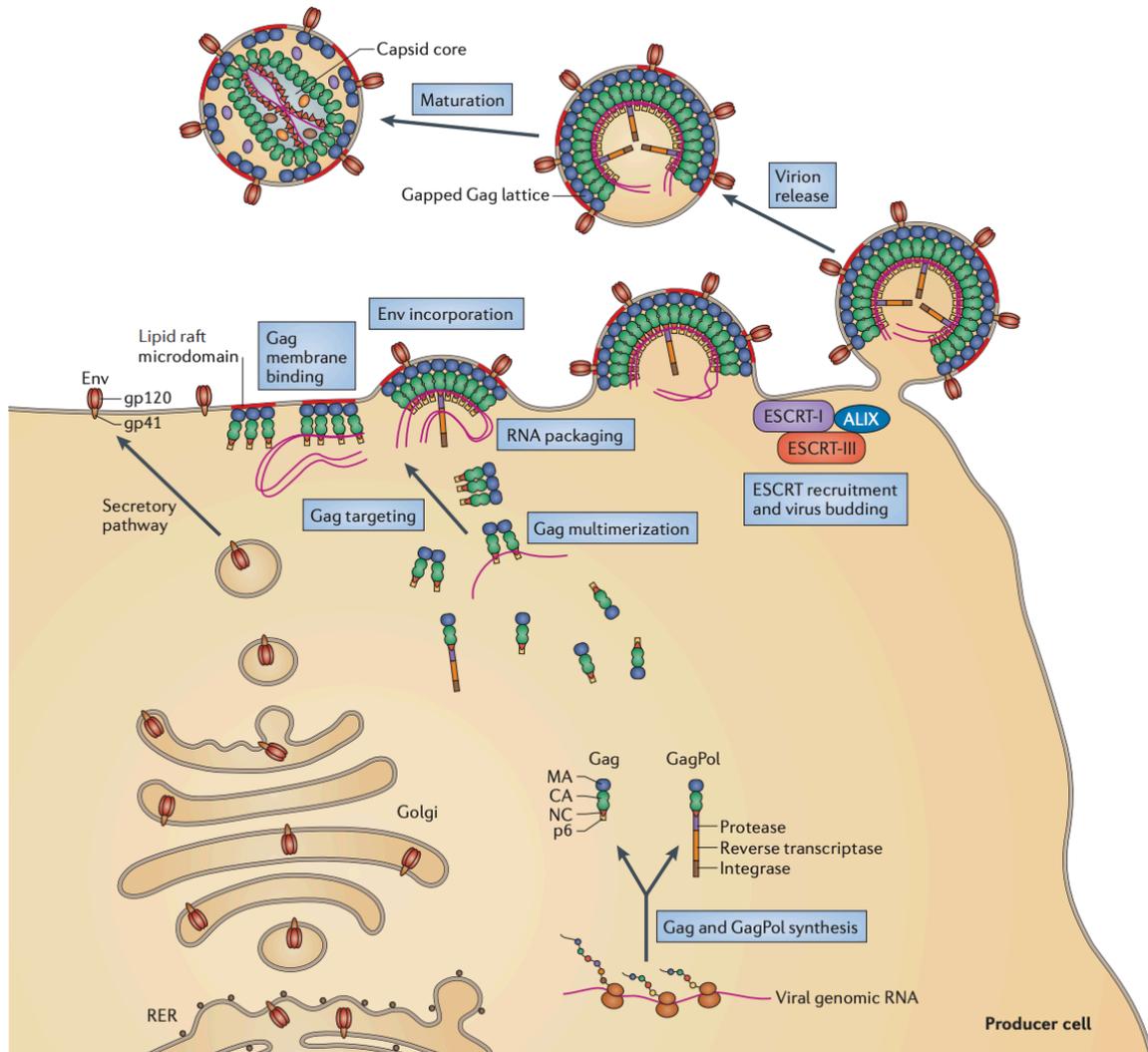


Figure 6 - Assemblage, bourgeonnement et maturation d'un virion de VIH-1. Freed, 2015 (67). La transcription des provirus intégrés permet la production des polyprotéines Gag et GagPol (« Gag and GagPol synthesis »). Ces polyprotéines se mutlimérisent (« Gag multimerization ») tout en étant exportées à la membrane plasmique (« Gag targeting »). En parallèle la protéine virale Env est adressée à la membrane plasmique grâce au réticulum endoplasmique rugueux (RER). Après incorporation de Env et du génome viral sur le site d'assemblage (« Env incorporation », « RNA packaging »), la machinerie ESCRT permet le bourgeonnement et la libération du virion (« Virion release »). La protéase virale permet alors le clivage protéolytique des protéines virales et la formation d'un virion mature (« Maturation »).

1.7. Le Réservoir

Le développement des premières thérapies antirétrovirales (ART) suscite l'espoir qu'un traitement prolongé puisse éradiquer le virus et guérir la maladie. Perelson *et al* ont été les premiers à évaluer le temps nécessaire sous ART pour éradiquer le virus de l'organisme. En extrapolant que le virus ait infecté 10^{12} cellules (une valeur haute qui correspond au nombre total de lymphocytes dans l'organisme) ils estiment à 3 ans le temps nécessaire pour atteindre <1 cellule infectée ⁶⁸. Malheureusement la prédiction de Perelson *et al* a une limite : elle suppose que les cellules infectées les plus stables aient une demi-vie de deux semaines et ne prend pas en compte la possibilité de réservoirs viraux indétectables. Moins d'un an après l'introduction de la trithérapie, l'existence du réservoir est formellement démontrée dans les CD4 de patients infectés par le virus ⁶⁹⁻⁷¹. Le réservoir est un ensemble de cellules infectées de manière latente. La latence définit un état infectieux non productif et réversible, ce qui dans le contexte de l'infection à VIH-1 se traduit par la présence de provirus transcriptionnellement inactif, intégré dans le génome cellulaire, et compétent pour la réplication. Les cellules du réservoir sont extrêmement stables avec une demi-vie estimée à 43,9 mois. Une demi-vie aussi longue nécessiterait 60 ans de traitement sous ART pour parvenir à l'éradication du réservoir latent ⁷². De plus, la plupart des cellules du réservoir produisent peu ou pas d'antigènes viraux, les protégeant ainsi contre les effets cytopathiques du virus et de la réponse lymphocytaire T CD8 (LT CD8).

1.7.1. Types cellulaires impliqués dans l'établissement de la latence

Les LT CD4 sont la cible principale du virus et constituent en toute logique la majorité du réservoir. Il est possible de classer les LT CD4 en sous-groupes en fonction de l'expression de marqueurs de surface reflétant leur état de différenciation et leur fonction effectrice. On distingue les LT CD4 naïfs, souches mémoires (T_{SCM}), centrales mémoires (T_{CM}), transitionnels mémoires (T_{TM}), effecteurs mémoires (T_{EM}), résidents mémoires (T_{RM}) et terminales différenciés (T_{TD}) ⁷³. Bien qu'il soit admis que tous les LT CD4 mémoires contribuent au réservoir, certaines sous-populations semblent jouer un rôle plus important que d'autres. Les T_{SCM} , une sous-population minoritaire (2 à 4 % des lymphocytes circulants), contiennent une proportion plus importante de cellules avec de l'ADN viral que les T naïves, T_{CM} , T_{EM} et T_{TD} . Du fait de leur durée de vie importante et de leur capacité

d'autorenouvellement, les T_{SCM} constituent probablement une part significative du réservoir⁷⁴. Plusieurs études ont également montré le rôle des T_{CM} dans la composition du réservoir. Chomont *et al* ont démontré que les T_{CM} et T_{TM} étaient particulièrement enrichis en ADN viral, et que la persistance des deux types cellulaires était médiée par des mécanismes distincts⁷⁵. Brenchley *et al* ont obtenu des résultats similaires montrant que les T_{CM} contiennent 10 fois plus d'ADN viral que les T_{TD}⁷⁶.

Ces observations sont cruciales pour la caractérisation du réservoir mais il est toutefois important d'apporter une nuance. La majorité du réservoir est constituée de provirus défectueux, ce qui signifie que la détection d'ADN viral dans une sous-population donnée ne garantit pas qu'il s'agisse de provirus inductibles, capables de propager l'infection⁶⁹. Soriano-Sarabia *et al* ont ainsi démontré que les T_{TM} contiennent majoritairement des provirus défectueux tandis que les T_{CM} semblent être la source principale de provirus inductibles⁷⁷. De plus les T_{CM} expriment à leur surface CD62L et CCR7. Ces deux molécules de surface permettent la migration vers les ganglions lymphatiques, l'un des sites majeurs de réplication du virus⁷⁸. Enfin, ces cellules disposent d'une durée de vie et d'un potentiel d'autorenouvellement important. Pour toutes ces raisons les T_{CM} sont une cible de choix pour la persistance virale et sont considérées comme le réservoir majeur de l'infection à VIH-1⁷³.

Le rôle des macrophages dans le réservoir est activement débattu. Les macrophages expriment CD4 et CCR5 et sont infectés par le virus sans être sensibles à l'effet cytopathique de l'infection⁷⁹. Ils disposent également d'une durée de vie importante et sont localisés dans tous les organes, tissus et compartiments du corps, faisant d'eux une cible intéressante pour l'établissement d'un réservoir stable⁸⁰. Des macrophages infectés de manière latente ont pu être détectés dans les ganglions lymphatiques et dans le tissu urétral⁸¹. Ganor *et al* ont d'ailleurs démontré que les macrophages urétraux d'individus sous ART contenaient des provirus compétents pour la réplication⁸². De plus, les macrophages participent à la pathogenèse de la maladie en migrant vers des sites sanctuaires pour y propager l'infection. Leur rôle dans la propagation de l'infection vers le système nerveux central (SNC) était déjà connu à la fin des années 80, aussi bien chez l'Homme que chez le singe^{83,84}. En revanche la contribution des macrophages au réservoir latent dans ces sanctuaires n'est pas clairement établie. L'étude du rôle des macrophages dans le maintien du réservoir est complexe à cause de la diversité de ces cellules. Leur différenciation est spécifique à chaque tissu, ce qui génère des cellules hautement spécialisées avec des morphologies et fonctions différentes. Ainsi, tous

les macrophages ne présentent probablement pas les mêmes susceptibilités à l'infection et au maintien d'un réservoir latent. Les macrophages du GALT sont notamment réfractaires à l'infection tandis que les macrophages alvéolaires y sont sensibles ⁷³. Des études supplémentaires seront nécessaires pour évaluer l'implication des macrophages dans le réservoir et la persistance virale. D'autres types cellulaires ont parfois été associés avec le réservoir, notamment les cellules dendritiques, les précurseurs hématopoïétiques, cellules épithéliales, astrocytes, etc. Cependant leur contribution au réservoir est débattu et doit être évalué ⁷³.

1.7.2. Les mécanismes d'induction de la latence

A première vue l'existence d'un réservoir latent est paradoxale dans le cadre de l'infection à VIH-1, et ceci pour deux raisons. La première, c'est que le virus cible spécifiquement les CD4 activées ⁸⁵. Les CD4 activées se distinguent par une expression accrue de CCR5, ce qui facilite l'infection, et de divers facteurs de transcriptions essentiels pour la transcription du provirus intégré ⁸⁶. La deuxième, c'est que le virus s'intègre préférentiellement dans des régions transcriptionnellement actives ^{87,88}. Une étude de Han *et al* a montré que sur 74 sites d'intégrations répartis sur 16 patients, 93 % se trouvent dans des gènes activement transcrits. La tendance du virus à s'intégrer dans des régions du génome riche en euchromatine confirme ces résultats ^{89,90}. Comment expliquer alors qu'un virus avec un tropisme pour des cellules activées et qui s'intègre préférentiellement dans des régions transcriptionnellement actives puisse retourner à un état de latence ?

Une forme de latence peut être induite lorsque le virus infecte une cellule pendant le processus de retour à la quiescence (Figure 7). Dans cette situation la cellule peut être permissive pour l'infection, la rétrotranscription et l'intégration dans le génome cellulaire mais pas pour la transcription des gènes viraux ⁸⁶. Le retour à la quiescence est associé à des modifications transcriptionnelles et épigénétiques majeures compromettant la transcription des gènes viraux. Le facteur de transcription NFκB est notablement séquestré dans le cytoplasme et son absence du compartiment nucléaire pourrait empêcher la transcription du provirus ⁸⁶. Les modifications épigénétiques jouent également un rôle important. Récemment le rôle du complexe HUSH a été mis en avant dans la répression transcriptionnelle des provirus intégrés. HUSH induit la propagation de marques épigénétiques H3K9me3 répressives via le recrutement d'une enzyme de méthylation ^{91,92}. L'accumulation de marques

répressives provoque la compaction de la chromatine et empêche la machinerie transcriptionnelle d'accéder au promoteur du provirus pour y initier la transcription.

D'autres mécanismes ont été proposés pour expliquer la latence virale, notamment le rôle du site d'intégration du provirus. Les gènes *Bach2* et *Mkl2* codent pour des facteurs de transcription impliquée dans la prolifération cellulaire et sont des sites récurrents d'intégration. Il a été suggéré que l'intégration du virus dans ces gènes puisse être à l'origine de la prolifération clonale et de la survie de la cellule infectée⁹³⁻⁹⁵. Alors que les travaux préliminaires sur la prolifération clonale de cellules infectées montraient que ces dernières contenaient des provirus défectueux, Simonetti et al ont démontré la présence de provirus inductible au sein de ces clones⁹⁶. Ainsi, la prolifération clonale médiée par le site d'intégration du provirus est probablement un mécanisme pertinent de la persistance virale. Par ailleurs, l'intégration de VIH-1 dans des zones transcriptionnellement actives n'est pas systématique et le virus peut occasionnellement s'intégrer dans des régions du génome défavorable à la transcription, et donc induire la latence⁹⁷. Un autre mécanisme possible d'induction de la latence fait intervenir le facteur viral Tat. Après intégration une forte activité de Tat est associée à la transcription du génome viral tandis qu'une faible activité induit la latence⁹⁸. C'est pourquoi il a également été proposé que des mutations de Tat puissent compromettre la transcription des gènes viraux⁹⁹.

Les mécanismes présentés ici ne sont pas forcément mutuellement exclusifs et peuvent coopérer pour induire la latence. De plus, au vu de la diversité du réservoir il est probable que les mécanismes responsables de la latence diffèrent d'un type cellulaire à l'autre. Enfin, bien que les bases moléculaires de la latence commencent à être connues, beaucoup de zones d'ombres subsistent.

1.7.3. Dynamique d'établissement du réservoir

Les données actuelles tendent à montrer que le réservoir s'établit très tôt dans l'infection, lorsque la charge virale est indétectable. L'initiation du traitement dix jours après l'apparition des premiers symptômes pendant la primo-infection n'empêche pas l'établissement du réservoir¹⁰⁰. Plus récemment il a été démontré qu'une interruption de traitement chez des individus traités depuis la phase Fiebig I (soit pendant les deux premières semaines de l'infection) est suivie d'un rebond viral rapide¹⁰¹. Dans le contexte du SIV on

observe des rebonds viraux chez des singes ayant commencé le traitement seulement trois jours après infection ¹⁰². Par ailleurs, des nourrissons infectés par le virus à la naissance et mis sous traitement entre 12 et 30 heures après l'accouchement connaissent un rebond de la charge virale si le traitement est interrompu ^{103,104}. Collectivement ces résultats pointent vers un établissement très tôt du réservoir, probablement dans les 72 premières heures de l'infection pendant la phase d'éclipse.

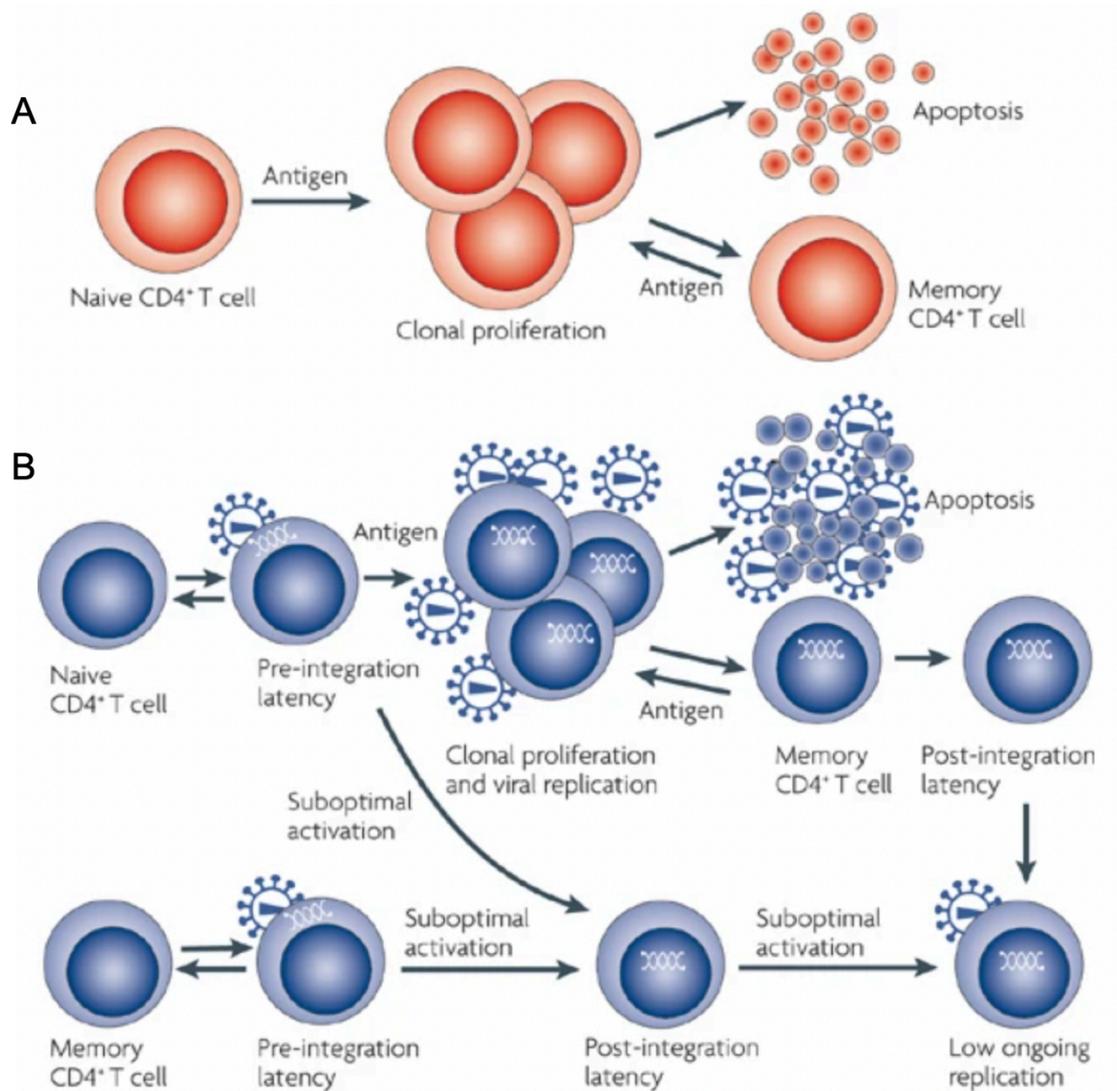


Figure 7 – Induction de la latence pendant le retour à la quiescence d’une cellule infectée. Adapté de Coiras et al. A- Expansion clonale d’une cellule CD4 naïve après reconnaissance de son antigène spécifique. Lorsque le pathogène est éradiqué, les cellules T entrent en apoptose (contraction) ou se différencient en cellules mémoires et deviennent quiescentes. B – La plupart des LT CD4 infectés par VIH sont voués à mourir par apoptose mais un petit nombre retourne à la quiescence et forme le réservoir.

Partie 2 : Stratégies thérapeutiques et contrôle de l'infection

2.1. Antirétroviraux et cibles virales

Le développement des thérapies antirétrovirales, délivré sous la forme d'une pilule par jour, a transformé l'infection à VIH en maladie chronique. Plus de 28,7 millions de personnes sont aujourd'hui sous traitement ¹⁰⁵. Le traitement permet de diminuer la charge virale à des niveaux indétectables dans la majorité des individus infectés prolongeant ainsi leur espérance de vie et réduisant par la même occasion le risque de transmission ¹⁰⁶. Les antirétroviraux actuels ciblent soit l'entrée du virus dans la cellule soit l'une des trois enzymes codées par VIH pour mener à bien son cycle infectieux. On peut alors séparer les antirétroviraux en 4 classes : les inhibiteurs de l'entrée du virus, de la transcriptase inverse (RT), de l'intégrase (IN) et de la protéase (PR). Le traitement actuel repose sur l'administration simultanée de composés antirétroviraux de différentes classes, on parle de thérapie antirétrovirale combinée ou cART (combined ART).

2.1.1. Les inhibiteurs d'entrée

Les inhibiteurs d'entrée interagissent avec un des facteurs viraux (gp120 et gp41 de Env) ou cellulaires (récepteur CD4 et co-récepteurs CCR5/CXCR4) impliqués dans l'entrée du virion ^{60,107}. Le **Fostemsavir** intervient très tôt en empêchant l'attachement du virion à la cellule cible. Il y parvient en se fixant à gp120 ce qui limite l'interaction CD4-gp120 ¹⁰⁸. **L'Ibalizumab** est un autre inhibiteur d'entrée qui intervient en aval du Fostemsavir. Il s'agit d'un anticorps monoclonal qui se fixe sur le récepteur CD4 pour empêcher l'interaction de ce dernier avec les co-récepteurs CCR5/CXCR4 ¹⁰⁹. Le **Maraviroc** est un inhibiteur allostérique qui s'intercale dans la cavité transmembranaire du co-récepteur CCR5. Il provoque un changement de conformation de CCR5 qui empêche l'interaction d'Env avec ce dernier ¹¹⁰. D'autres antagonistes de CCR5 existent mais ont vu leur essai clinique interrompu à cause d'une toxicité hépatique trop importante (Aplaviroc) ou d'une efficacité réduite par rapport au traitement actuel (Vicriviroc) ^{111,112}. Ces molécules sont indiquées dans le cas d'une infection avec un virus présentant un tropisme pour CCR5. Les inhibiteurs d'entrée visant

CXCR4 existent mais ne sont pas approuvés pour un usage clinique ¹¹³⁻¹¹⁶. **L'Enfuvirtide** est le premier inhibiteur d'entrée à avoir été utilisé dans le cadre de l'infection à VIH. Il s'agit d'un peptide de 36 acides aminés dont la séquence présente une forte homologie avec la sous-unité gp41 virale. L'Enfuvirtide interagit avec gp41 et inhibe les fusions des membranes cellulaires et virales ^{117,118}. Son utilisation est cependant limitée à cause d'une faible biodisponibilité orale qui oblige la molécule à être administrée par injection sous-cutanée.

2.1.2. Les inhibiteurs de la transcriptase inverse

Les inhibiteurs de la RT occupent une place particulière dans le traitement de l'infection à VIH. Le premier composé antiviral utilisé pour le traitement de l'infection, l'AZT, est un inhibiteur de la RT. Parmi les 30 composés actuellement approuvés pour le traitement de l'infection à VIH, 14 sont des inhibiteurs de la RT. Il existe deux types d'inhibiteurs de la RT. Les inhibiteurs nucléosidiques (INTI) sont des analogues de nucléosides qui ne présentent pas de groupement hydroxyle en 3'. Cela permet de bloquer la synthèse d'ADN après incorporation du composé par la RT. C'est le mode d'action de l'AZT mais également du lamivudine, emtricitabine, didanosine, stavudine, abacavir, zalcitabine et tenofovir (le tenofovir est un analogue nucléotidique). Les inhibiteurs non nucléosidiques (INNTI) agissent par un mécanisme distinct. Comme leur nom l'indique, ce ne sont pas des analogues nucléosidiques ayant la vocation d'être incorporés, mais des inhibiteurs directs de la RT. La névirapine, par exemple, se fixe sur la RT et provoque un changement de sa conformation. Ce processus limite l'incorporation de nucléotides par la RT et empêche la synthèse de l'ADN viral. En plus de la névirapine, on trouve au sein des INNTI l'efavirenz, étravirine, delavirdine, rilpivirine et doravirine.

2.1.3. Les inhibiteurs de l'intégrase

Les inhibiteurs de transferts de brins de l'intégrase (INSTIs) sont la dernière classe d'antirétroviraux à avoir été mis sur le marché. Aujourd'hui quatre INSTIs sont approuvés pour le traitement de l'infection à VIH : raltégravir, elvitégravir, dolutégravir et bictégravir. Ils agissent en bloquant sélectivement l'étape de transfert de brin de l'intégrase ¹¹⁹.

2.1.4. Les inhibiteurs de la protéase

Il existe 10 inhibiteurs de la protéase approuvés pour un usage clinique. Tous, à l'exception du tipranavir, sont des peptidomimétiques. Ils interagissent avec le site actif de la protéase et empêchent ainsi le clivage protéolytique des précurseurs de Gag et GagPol. On trouve l'amprenavir, tipranavir, indinavir, saquinavir, fosamprenavir, ritonavir, darunavir, atazanavir, nelfinavir et lopinavir.

2.2. Les problématiques du vaccin contre VIH

Le traitement prolongé ne permet pas l'éradication du virus et favorise l'incidence de comorbidités non-liées au SIDA (SNAE, *serious non-AIDS events*). Les SNAEs sont d'ailleurs devenus la source principale de morbidité et de mortalité sous l'ère des thérapies antirétrovirales et nuisent à la qualité de vie des personnes vivant avec le VIH ¹²⁰. De plus, chaque nouvelle infection augmente le nombre de personnes nécessitant un traitement à vie. C'est pourquoi il y a un besoin urgent de développer de nouvelles stratégies curatives destinées à empêcher la transmission et propagation. Malheureusement tous les vaccins développés à ce jour ont échoué ou montré une efficacité très limitée. Le VIH reste probablement le plus grand défi de la vaccinologie moderne et ceci pour plusieurs raisons.

La variabilité du virus est un premier défi majeur. Le caractère mutagène de VIH est souvent mis en avant mais il est parfois difficile de concevoir l'étendue de sa diversité. Le virus à ARN Influenza est connu lui aussi pour être très variable et peut servir de comparaison. L'arbre phylogénétique de l'hémagglutinine (HA) d'Influenza sur l'ensemble de l'année 1996 montre une diversité inférieure à celle de l'enveloppe de VIH séquencé à Amsterdam entre 1990 et 1991. Par ailleurs, la diversité des séquences d'Influenza globale de n'importe quelle année est équivalente à la diversité de VIH observée chez un seul individu à un moment donné ¹²¹. De plus, la séquence de la protéine Env peut différer de 20% entre des virus du même sous-groupe et de 35% entre des virus de sous-groupes différents ¹⁴. L'énorme variabilité de VIH lui permet ainsi d'échapper aux réponses cytotoxiques des LT CD8 mais également aux anticorps neutralisants. Ainsi, la diversité à laquelle un potentiel vaccin contre VIH doit faire face est plus importante que dans le contexte de l'infection à Influenza, une infection qui nécessite déjà des modifications périodiques du vaccin pour contrer l'apparition

de nouveaux variants. De plus, pour la plupart des pathogènes contre lesquels un vaccin efficace a été développé (variole, rougeole, poliovirus) il existe un modèle de protection naturelle : l'éradication du pathogène par le système immunitaire confère une protection durable contre une éventuelle réinfection. Cette observation est le fondement de l'un des piliers de la vaccinologie : le meilleur moyen de développer un vaccin efficace est de créer un vaccin qui imite l'infection naturelle. Ce principe n'est pas applicable à VIH où la réponse naturelle à l'infection est partiellement protectrice et ne permet pas l'éradication du virus ¹²². Ainsi dans le contexte de l'infection à VIH le but n'est pas de développer un vaccin qui imite l'infection naturelle, mais qui permet d'améliorer la réponse immunitaire quantitativement et/ou qualitativement. Ce concept est appelé induction de « l'immunité non naturelle » ¹²³. Une autre difficulté réside dans le fait que la plupart des vaccins efficaces cherchent à empêcher le développement de la maladie, pas l'infection. Cette nuance est importante car une simple infection à VIH est synonyme de l'établissement d'un réservoir latent que l'on ne parvient pas à éradiquer, indépendamment de la progression clinique de la maladie. Un objectif plus atteignable serait d'instaurer un contrôle partiel se traduisant par une virémie réduite, un point d'équilibre viral plus bas et une progression plus lente de la maladie. Puisque la charge virale est un déterminant important de la transmission du virus, il est concevable qu'un tel vaccin puisse avoir un effet protecteur à l'échelle d'une population. Cet objectif plus modeste est appelé guérison fonctionnelle, ou *functional cure*.

2.3. La guérison fonctionnelle

En 2007 un individu infecté par VIH vivant à Berlin développe un leucémie aiguë myéloïde et subit une transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques d'un donneur homozygote pour une mutation sur le gène de CCR5 (CCR5-Δ32) ¹²⁴. Cette mutation sur le gène du co-récepteur principal de VIH rend les cellules hautement résistantes à l'infection. La procédure fonctionne et le patient de Berlin maintiendra une charge virale indétectable jusqu'à son décès le 29 septembre 2020, 13 ans après la transplantation. Une approche similaire a été utilisée dans le cadre des « patients de Boston », deux individus ayant développé des lymphomes réfractaires et traités par transplantation de cellules souches hématopoïétiques avec la mutation CCR5-Δ32 ¹²⁵. La charge virale chez ces individus a graduellement diminué pendant le traitement jusqu'à des niveaux indétectables. Après interruption du traitement la charge virale est restée indétectable pendant plusieurs semaines,

suggérant une guérison totale de l'infection, jusqu'à un rebond 12 et 32 semaines après l'interruption de traitement. Ces échecs suggèrent que l'éradication du réservoir est une nécessité absolue pour parvenir à une guérison totale de l'infection. Un réservoir même très faible, comme celui présent chez les patients de Boston, aboutira à un rebond de la charge virale après un certain temps (Figure 8).

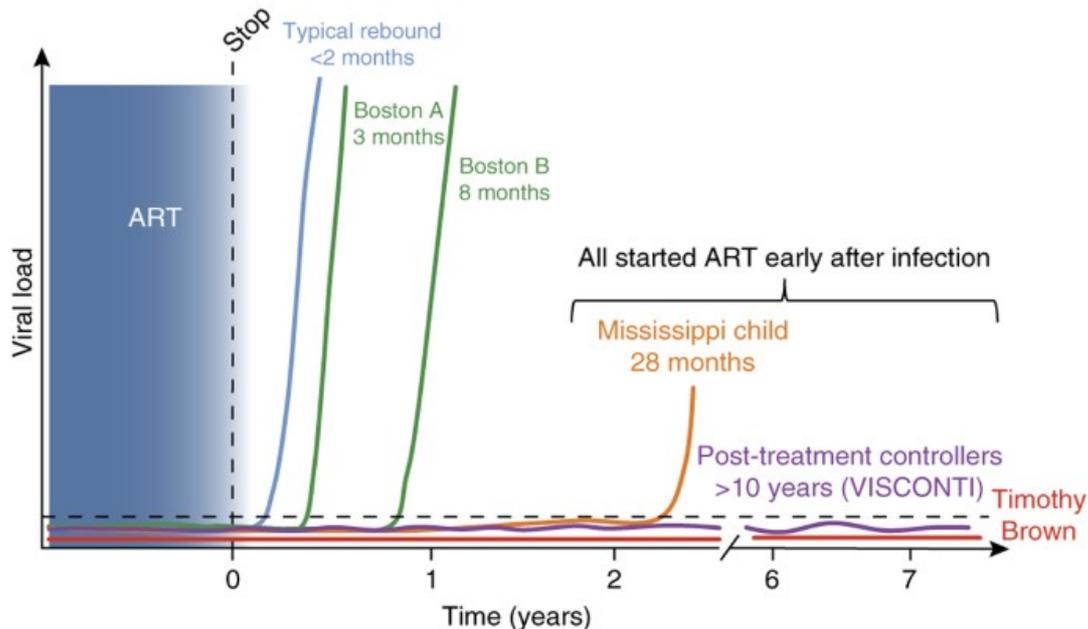


Figure 8 – Cas connus de rémission prolongée de l'infection à VIH-1. Cette figure représente les cas connus de rémission prolongée de l'infection. Le rebond viral intervient moins de 2 mois après interruption de traitement pour la majorité des individus infectés par VIH-1 (courbe bleue). Le rebond de la charge virale des patients de Boston est intervenu 3 et 8 mois après l'interruption de traitement (courbes vertes). Le « Mississippi child », traité par cART 30 heures après sa naissance à maintenu une charge virale indétectable pendant plus de 2 ans après interruption thérapeutiques (courbe jaune). Les individus « post treatment controllers » de la cohorte VISCONTI ont été traité à partir des phases Fiebig III de l'infection et maintiennent une charge virale indétectable depuis des années (courbe violette). Le patient de Berlin (Timothy Brown) a maintenu une charge virale indétectable pendant 13 ans jusqu'à son décès (non lié au VIH) après une transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétique CCR5-Δ32 (courbe rouge). Deeks et al 2016.

Il est important de noter que le rebond chez les patients de Boston est arrivé avec un délai conséquent par comparaison avec un rebond viral typique. Cela suggère qu'il existe une corrélation entre la taille du réservoir et le temps avant le rebond viral. Les observations faites chez le « Mississippi child » vont dans ce sens. L'enfant a été mis sous ART quelques heures après sa naissance, limitant l'établissement du réservoir, et a maintenu une charge virale indétectable pendant quasiment 2 ans sans traitement ¹²⁶. Conjointement ces résultats suggèrent une alternative à la guérison totale ou immunité stérilisante. Plutôt que de chercher

l'éradication totale du réservoir, il serait possible de diminuer sa taille de manière à ce que la réactivation des provirus latents deviennent un événement rare ¹²⁷. Cela permettrait aux personnes vivant avec le VIH d'arrêter le traitement pendant des périodes prolongées pour limiter à la fois les effets secondaires mais aussi l'apparition de mutation de résistance au traitement. L'initiation précoce du traitement est l'une des stratégies permettant de limiter l'établissement du réservoir. Les individus ayant commencé le traitement dans les six premiers mois de l'infection présentent un réservoir de taille réduite par rapport à ceux ayant commencé pendant l'infection chronique ¹²⁸⁻¹³⁰. L'initiation précoce de ART est également associée à une déplétion moins marquée des CD4, une meilleure reconstitution des ressources immunitaires et un risque réduit de développer un syndrome inflammatoire de reconstitution immunitaire (IRIS) ¹³¹.

2.3.1. La stratégie du « shock and kill »

La stratégie « shock and kill » a été initialement développée pour tenter d'éradiquer le réservoir latent. La stratégie repose sur deux étapes clés. Pendant la phase *shock* des agents de réversion de la latence (LRA) interrompent la latence des provirus intégrés et induisent la production de protéines virales et de virions par les cellules du réservoir (Figure 9). Les cellules du réservoir réactivées sont alors éliminées directement par les effets cytopathiques du virus ou par des mécanismes cytotoxiques sous la dépendance des LT CD8 et des NK, c'est la phase *kill* ¹³². A ce jour la stratégie *shock and kill* a montré des résultats décevants, ne

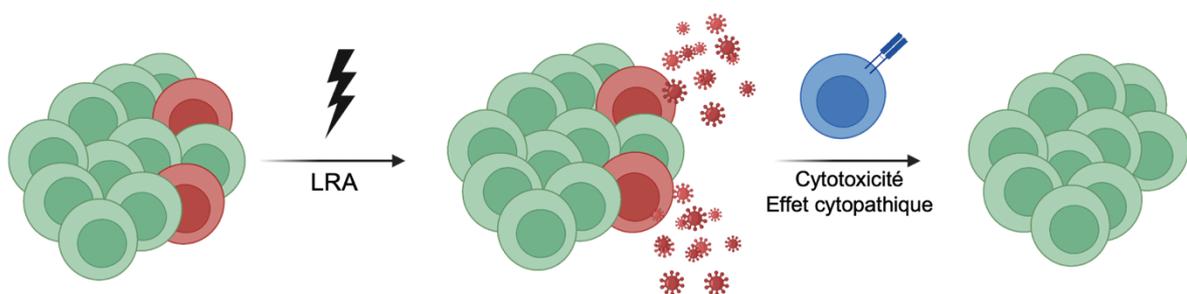


Figure 9 - Principe général de la stratégie "shock and kill". La première phase fait intervenir des agents de réversion de la latence (LRA) qui permettent de « réveiller » les provirus latents et induire la production de particules virales, c'est la phase "shock". Les cellules réactivées du réservoir sont alors lysées par les LT CD8 et les NK de l'hôte c'est la phase « kill ». Cellule verte : LT CD4 non-infectés, cellule rouge : LT CD4 infectés de manière latente, cellule bleue : LT CD8.

parvenant pas à réduire de manière significative la taille du réservoir. Cet échec provient à la fois de l'incapacité des LRA de réactiver complètement le réservoir, mais également de l'incapacité de la réponse immunitaire de l'hôte d'éradiquer les cellules réactivées du réservoir.

Il existe plusieurs classes de LRA qui se distinguent en fonction de leur mode d'action. Parmi les classes les plus importantes on trouve les inhibiteurs de l'histone déacétylase (HDAC), les inhibiteurs de l'histone méthyltransférase (HMT), les inhibiteurs des méthyltransférases de l'ADN (DNMTs), les inhibiteurs de bromodomaines, les agonistes de la protéine kinase C (PKC) et les inhibiteurs de la voie PI3K/AKT ¹³³. Seul un nombre limité de ces molécules a été testé dans des essais cliniques. C'est notamment le cas du vorinostat, panobinostat et du romidepsin, tous trois inhibiteurs de l'HDAC ¹³⁴⁻¹³⁷. Ces essais cliniques ont mis en évidence une augmentation de la réplication virale sans pour autant réduire la taille du réservoir. Plus récemment il a été montré que des dérivés d'esters d'ingénol (ingénol B et mébutate d'ingénol) sont capables de réactiver VIH-1 *in vivo* et *ex vivo* mais également de réactiver SIV *in vivo* dans un modèle de macaques ¹³⁸⁻¹⁴¹. Ces observations montrent qu'il est possible de réactiver le réservoir en utilisant des LRA, cependant certaines limitations persistent. Le réservoir est composé d'un ensemble de cellules hétérogènes du point de vue du type cellulaire, du phénotype et du profil de différenciation. De plus il existe plusieurs mécanismes à l'origine de la latence. Il est donc concevable qu'un LRA donné ne puisse pas réactiver l'ensemble du réservoir au vu de son hétérogénéité. L'utilisation simultanée de plusieurs LRA avec des mécanismes distincts ne résout pas le problème car les LRA restent trop peu spécifiques, sont associés à une toxicité élevée et peuvent inhiber les fonctions des LT CD8, compromettant ainsi la phase *kill* ¹⁴².

La phase *kill* n'est pas non plus exempte de tout reproche dans l'échec des stratégies *shock and kill*. Plusieurs études ont montré que les cellules du réservoir réactivées par les LRA ne sont pas lysées par les fonctions cytotoxiques des LT CD8. Comme mentionné dans le paragraphe précédent certains LRA ont des effets immunomodulateurs vis-à-vis des LT CD8. C'est par exemple le cas de la combinaison romidepsin/bryostatine qui est très efficace pour réactiver le réservoir *in vitro* mais qui induit une expression accrue et soutenue de récepteurs d'inhibition par les LT CD8 (PD-1 et CD160 notamment) ¹⁴³. Cette combinaison est suffisante pour complètement abolir les capacités suppressives de LT CD8 provenant de quatre Elite Controllers (EC) *in vitro*. Sans même considérer le rôle potentiellement inhibiteur

des LRA, les LT CD8 chez les individus infectés par VIH sont connus pour être sous-optimaux. Ils sont caractérisés par des capacités prolifératives réduites, de moins bonnes fonctions effectrices et un profil de différenciation associé à l'épuisement¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Shan *et al* ont notamment démontré dans un modèle *in vitro* que des LT CD4 infectés de manière latente survivent aux effets cytopathiques du virus après réactivation mais également à la présence de LT CD8 autologues¹⁴⁷. Dans cette étude une stimulation antigénique en amont du *shock and kill* a permis de restaurer les capacités cytolytiques des CTL, suggérant qu'il est possible d'améliorer les fonctions effectrices des LT CD8. Le manque de spécificité des LRA associé à l'incapacité du système immunitaire d'éradiquer les cellules réactivées du réservoir expliquent en partie les nombreux échecs de la stratégie *shock and kill*. Ainsi les phases *shock* et *kill* nécessitent toutes les deux une optimisation avant de permettre une réduction significative de la taille du réservoir VIH.

2.3.2. La stratégie du « *block and lock* »

Le succès limité du *shock and kill* a poussé les chercheurs à trouver des alternatives ne nécessitant pas la réactivation du réservoir latent. La stratégie *block and lock* est née de cette volonté. L'objectif de cette stratégie n'est pas de réactiver le provirus latent mais au contraire de maintenir de manière durable la latence. Cette stratégie permettrait d'empêcher la réactivation et la transcription des gènes viraux dans les cellules du réservoir^{148,149}. Il existe plusieurs stratégies de *block and lock* agissant sur des déterminants distincts de la transcription des gènes viraux. La stratégie la plus prometteuse utilise un inhibiteur du facteur viral Tat appelé didehydro-cortistatin (dCA)¹⁵⁰. Tat est un facteur viral impliqué dans le recrutement du complexe P-TEFb et de l'ARN polymérase II permettant d'initier la transcription des gènes viraux au niveau du promoteur LTR. Tat est une cible intéressante car c'est la première protéine virale produite pendant l'infection et il n'existe pas d'homologue cellulaire. L'inhibition de Tat par dCA empêche la transcription des gènes viraux même après stimulation par différents LRA^{150,151}. En plus des inhibiteurs de Tat d'autres composés sont actuellement testés pour leur capacité à empêcher la transcription des gènes viraux : les LEDGINS, les inhibiteurs de FACT, les inhibiteurs de HSP90 (*Heat Shock Protein 90*), les inhibiteurs de Jak-STAT, les inhibiteurs de kinase, les inhibiteurs de mTOR et enfin les modulateurs de BRD4. Un critère important pour juger de l'efficacité des stratégies *block and lock* est la durée entre l'interruption de traitement et le rebond viral. A ce jour la plupart de

ces composés ont été testés dans des modèles de souris humanisées. Le traitement par le cDA a ainsi permis de repousser le rebond viral à 19 jours contre seulement 10 pour les souris contrôles, et les inhibiteurs de HSP90 ont réussi à repousser le rebond de 11 semaines dans un modèle similaire^{152,153}. Bien que prometteur, aucun de ces composés n'a permis une rémission à long terme, que ce soit dans des lignées cellulaires ou dans un modèle animal.

2.4. Le contrôle efficace de l'infection

2.4.1. Les individus asymptomatiques à long terme

En l'absence de traitement la majorité des individus infectés par VIH progresse vers la maladie. Pourtant dès les années 1990, des individus qualifiés d'asymptomatiques à long terme ou *Long Term Non Progressors* (LNTP) sont identifiés. Les LNTPs représentent entre 5 à 15 % des individus infectés par VIH et sont caractérisés par le maintien d'un taux de CD4 élevé pendant plusieurs années en l'absence de symptômes cliniques¹⁵⁴⁻¹⁵⁷. Très vite il devient clair que les individus LNTPs forment en réalité un groupe hétérogène avec une réplication virale détectable à des niveaux très variables. Par ailleurs, une proportion importante de ces individus finira éventuellement par progresser vers la maladie¹⁵⁸. Le développement de techniques basées sur la PCR permettra une détection plus fine de la charge virale et l'identification de deux sous-groupes des LNTPs sur la base de la virémie.

Les individus *Viremic Controllers* (VC) sont capables en l'absence de traitement de contrôler partiellement la charge virale (entre 200 et 2000 copies d'ARN viral/mL) et de maintenir un taux de CD4 élevé, typiquement au-dessus de 500 cellules/mm³^{159,160}. Les *Elite* ou *HIV Controllers* (EC) montrent un contrôle supérieur de la virémie en étant capable de maintenir la charge virale sous la limite de détection (50 copies/mL) en l'absence de traitement. Les VC et EC sont donc définis sur un critère strictement virologique à la différence des LNTPs. Les EC représentent entre 0,2 et 1 % de la population séropositive selon les estimations, montrent des taux de CD4 plus importants et plus stables que les VC et progressent moins vite vers la maladie¹⁶¹⁻¹⁶⁴. Initialement il a été suggéré que les EC soient en réalité infectés par des variants mutés et atténués du VIH. Plusieurs travaux ont depuis démenti cette hypothèse. Blankson *et al* ont isolé des virus d'individus EC avec la même capacité de réplication que les virus d'individus progressseurs et les capacités répliquatives des

virus d'EC ont été confirmées *ex vivo* dans un modèle de souris humanisée ^{165,166}. Il existe également des cas connus de transmission de patients progresseurs vers des individus qui deviendront EC après l'infection ^{167,168}. De plus, l'analyse des séquences provirales d'EC montre un certain degré d'évolution suggérant une réplication active ¹⁶⁹. L'étude de la primo-infection chez ces individus a permis de montrer une virémie réduite pendant les premières semaines de l'infection par rapport à ce que l'on observe chez les progresseurs. Morley *et al* ont notamment pu suivre le déroulement de la primo-infection à partir du stade Fiebig I chez un individu qui deviendra EC. Le pic de virémie initiale est rapidement suivi d'une diminution impressionnante de la charge virale jusqu'à 0,84 copies/mL, à peu près au même moment où les progresseurs établissent le point d'équilibre viral. La charge virale est ensuite restée indétectable pendant 2 ans en l'absence de traitement ¹⁷⁰. Il est important de préciser qu'une charge virale indétectable chez les EC ne signifie pas que la réplication virale est inexistante. Certaines observations indiquent que la réplication est maintenue à un niveau très bas. L'utilisation d'une technique ultrasensible de quantification a évalué la charge virale plasmatique médiane d'individus EC à 2 copies/mL ¹⁷¹. A titre de comparaison, la même méthode estime la charge virale de patients progresseurs sous traitement à 13 copies/mL ¹⁷².

Bien que capable de contrôler efficacement l'infection, l'équilibre immunovirologique des EC n'est pas immuable. Une étude rétrospective de 15 ans a montré que les EC présentant des *blips* (sursauts temporaires de la charge virale) présentent une cinétique d'évolution du taux de LT CD4 avec une pente négative ¹⁷³. A l'inverse le taux de LT CD4 reste stable chez les patients n'ayant jamais eu de charge virale détectable. Une autre étude longitudinale sur 31 EC montre des résultats similaires. Dans cette étude une charge virale supérieure à 1 copie/mL est associée à une diminution progressive du taux de LT CD4. A l'inverse, les individus avec une virémie indétectable maintiennent un taux de LT CD4 stable. Il existe également plusieurs cas documentés d'EC ayant subitement progressé vers la maladie ¹⁷⁴. Ces résultats mettent en avant l'effet délétère de la réplication virale, même lorsque celle-ci intervient à des niveaux résiduels chez les EC.

2.4.2. Les contrôleurs post-traitement

Dans la plupart des domaines médicaux il existe des individus démontrant une réponse extrême aux traitements. Cette notion existe notamment en oncologie où la capacité de

répondre à un traitement inefficace pour la majorité des individus définit les « répondeurs exceptionnels »¹⁷⁵. Les contrôleurs post-traitement (PTC, *Post Treatment Controllers*) sont un cas particulier de contrôle de l'infection à VIH faisant écho aux répondeurs exceptionnels. Plusieurs travaux ont décrit le cas d'individus ayant commencé le traitement tôt, typiquement dans les 2-3 premiers mois de l'infection et ayant maintenu le traitement pendant des années (3-4 ans) qui, après interruption du traitement, montrent une certaine forme de contrôle de la charge virale¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. Les PTC diffèrent des EC sur un certain nombre de points. Les PTC présentent une charge virale importante pendant la primo-infection, ce qui n'est pas le cas des EC. Les membres de la cohorte *Viro-Immunological Sustained Control after Treatment Interruption* (VISCONTI) ont une charge virale médiane de 5 log₁₀ copies/mL pendant la primo-infection contre 2-3 log₁₀ copies/mL pour les EC^{159,176,179}. Par ailleurs, les EC sont enrichis en HLA-I dit protecteur comme B*57 ou B*27 tandis que ces allèles sont moins fréquents chez les PTC. A l'inverse la cohorte VISCONTI montre un enrichissement de HLA-B*35, un allèle associé à la progression de la maladie. Les PTC semblent également plus prévalents que les EC dans la population séropositive. La cohorte VISCONTI conjointement avec plusieurs autres travaux suggère une prévalence de 5 à 15%, bien supérieure aux EC (0,2 - 1%). Il est toutefois difficile d'estimer la prévalence exacte des PTC. Seule une minorité des individus infectés par le virus est identifiée et traitée tôt dans l'infection, ce qui semble être un facteur essentiel pour l'établissement du contrôle post-traitement. Enfin, les PTC se distinguent également des EC par une réponse LT CD8 moins efficace et un niveau d'activation des LT CD8 plus bas. Cette observation est intéressante car le contrôle de l'infection chez les EC est partiellement médié par les LT CD8. Cela suggère l'existence de mécanismes distincts chez les PTC leur permettant de contrôler la charge virale. Conjointement avec les EC, ces individus représentent un exemple idéal de contrôle durable de l'infection et l'étude des mécanismes responsables est cruciale pour le développement de stratégies de guérison fonctionnelle.

2.5. Corrélats de contrôle de l'infection à VIH

2.5.1. Les facteurs génétiques

L'identification d'individus capables de contrôler l'infection de manière efficace a permis d'identifier des facteurs génétiques associés à des évolutions cliniques distinctes. Très

tôt il est mis en évidence que certains HLA-I sont associés à une progression plus rapide de la maladie tandis que d'autres sont associés à un meilleur contrôle et une progression plus lente¹⁸⁰⁻¹⁸³. On trouve parmi les HLA-I protecteurs : HLA-B*1302, HLA-B*1402, HLA-B*27, HLA-B*4201, HLA-B*57, HLA-B*5801 et HLA-B*8101 et parmi les HLA-I associés à la progression : HLA-B*08, HLA-B*35 et HLA-B*45¹⁸⁴. Les HLA-I associés à la protection sont sur-représentés chez les EC, environ la moitié d'entre eux expriment HLA-B*57, HLA-B*5801 ou HLA-B*27¹⁸⁵. Ces observations suggèrent que la présentation antigénique au LT CD8 via le CMH-I est importante pour permettre un contrôle efficace de l'infection. D'une manière surprenante les PTC de la cohorte VISCONTI montrent un enrichissement d'un HLA- associé à la progression (B*35). De plus, les PTC ont des réponses LT CD8 moins fonctionnelles que celles observées chez les EC. Cela suggère l'existence d'un mécanisme distinct permettant de contrôler l'infection chez les PTC.

Le rôle du HLA de classe II dans le contrôle de l'infection a été démontré. L'expression des HLA-DRB1*13 et DQB1*06 ont été associés à une progression plus lente vers le stade SIDA¹⁸⁶. Dans cette étude les auteurs montrent qu'après stimulation par la protéine virale p24, les PBMC de ces patients présentent une prolifération supérieure et une production accrue d'IFN γ par rapport aux individus avec d'autres haplotypes. Chen *et al* ont associé HLA-DR13 à une survie plus longue chez des enfants infectés verticalement¹⁸⁷. Il a également été montré que l'expression de HLA-DRB1*1502 corrèle avec une faible charge virale tandis que HLA-DRB1*0302 est associé à une virémie importante¹⁸⁸.

CCR5 est le co-récepteur principal utilisé par VIH pour l'entrée dans les cellules cibles. Certains individus présentent une délétion de 32 paires de bases (Δ 32) à l'origine d'un codon stop prématuré. La protéine produite est tronquée et n'est pas exportée à la surface des cellules¹⁸⁹. L'homozygotie pour la mutation CCR5- Δ 32 permet une protection quasi complète contre l'infection, à condition que l'inoculum initial ne contienne que des virus avec un tropisme pour CCR5. Les individus hétérozygotes pour cette mutation n'ont pas le même niveau de protection vis-à-vis de l'infection mais présentent une évolution plus lente de la maladie¹⁹⁰. Il existe d'autres mutations capables de moduler la progression de la maladie. Des mutations sur RANTES (cytokine antiviral et ligand de CCR5) ou SDF1 (codant pour le ligand de CXCR4) accélèrent la progression de la maladie tandis qu'une mutation sur CCR2 (un récepteur de chemokine dont le gène est situé à seulement 10kb du gène de CCR5) induit une progression plus lente de la maladie¹⁹¹⁻¹⁹³.

Il arrive que certains individus avec un HLA protecteur progressent tout de même vers la maladie tandis que d'autres avec un HLA associé à la progression restent asymptomatiques. Ces observations suggèrent qu'il existe des mécanismes additionnels permettant d'expliquer le contrôle ou la progression chez les individus infectés par VIH.

2.5.2. *Les facteurs de restriction*

Au cours de leur évolution les mammifères ont développé des facteurs cellulaires capables d'interférer avec la réplication des rétrovirus. Ces composés sont appelés « facteurs de restriction » et forment la première ligne de défense face à une infection virale ¹⁹⁴. Parmi les facteurs de restriction importants on distingue la famille APOBEC3 (en particulier APOBEC3G), tetherin ou encore TRIM α . Plusieurs études ont montré le rôle des facteurs de restriction dans le contrôle naturel de l'infection. Les LT CD4 de patients EC expriment une quantité accrue de plusieurs facteurs de transcription (APOBEC3C, APOBEC3D, CTR9, TRIM26 et TRIM32) ¹⁹⁵. Les macrophages dérivés de monocytes et les LT CD4 d'individus EC ont une susceptibilité à l'infection réduite grâce à une expression accrue de facteur de restriction ¹⁹⁶. Enfin, les ECs produisent des quantités plus importantes des cytokines CCL4, CCL21, CCL27, XCL1 et SDF-1 par rapport aux patients non-contrôleurs (avec une charge virale importante) ou aux patients traités. La combinaison de ces 5 chemokines *in vitro* induit l'expression des facteurs de restriction IFITM1 et IFITM2, connus pour interférer avec le cycle de réplication de VIH ¹⁹⁷.

2.5.3. *La réponse innée*

Les DCs jouent un rôle important dans l'induction des réponses cellulaires T. Les travaux de Hamimi *et al* suggèrent que les DCs dérivant de monocytes (MDDCs) des individus EC sont résistants à l'infection et ont une capacité supérieure à capturer les particules virales via les récepteurs syndecan-3, DC-SIGN et MMR ¹⁹⁸. Les auteurs imaginent que la faible susceptibilité à l'infection permet aux MDDCs de préserver leurs fonctions et donc de faciliter la présentation croisée aux LT CD8 spécifiques du virus. La restriction de l'infection dans les MDDCs semble être sous la dépendance de SAMHD1, un facteur de restriction capable de réduire la concentration de nucléotide cytoplasmique (et donc d'inhiber

la synthèse d'ADN viral) et de dégrader directement l'ARN viral ^{199,200}. Pourtant d'une manière surprenante, les DCs de patients progressseurs montrent une susceptibilité encore plus réduite que les EC. Cette observation semble contre-intuitive à première vue. Pour tenter d'expliquer ce paradoxe, certains groupes ont émis l'hypothèse que la restriction de la réplication au sein des DCs n'est pas forcément un avantage pour l'hôte. Une réplication limitée au sein des DCs peut permettre au virus de limiter l'induction de réponse LT CD8 et CD4 en compromettant la présentation antigénique. Ce point de vue peut expliquer l'existence de réponses LT CD8 robustes chez les individus infectés par VIH-2 dont la protéine accessoire Vpx est capable d'antagoniser SAMHD1 ²⁰¹. D'une manière intéressante Su *et al* ont récemment démontré que des DCs en coculture avec des lymphocytes autologues perdent l'expression de SAMHD1 et deviennent permissives à l'infection. Ces DCs infectées *in vitro* ont acquis un profil de différenciation mature et produisent des quantités supérieures d'IFN de type I ²⁰². Des études supplémentaires seront nécessaires pour clarifier le rôle des DCs dans la pathogenèse de l'infection à VIH-1 et VIH-2 ²⁰³.

Les cellules Natural Killer (NK) sont des lymphocytes cytotoxiques appartenant au système immunitaire inné dont le rôle dans plusieurs infections virales a déjà été établi ²⁰⁴⁻²⁰⁶. Les NK sont classiquement divisés en 3 sous-populations qui se distinguent sur la base de l'expression de CD56 et CD16. On distingue la sous-population produisant des cytokines CD56⁺⁺ CD16⁻, la sous-population cytotoxique CD56⁺ CD16⁺ et enfin une sous-population mineure CD56⁻ CD16⁺ avec une faible activité antivirale ⁵¹. Les individus progressseurs montrent une accumulation de NK CD56⁻ CD16⁺ (parfois défini comme épuisé dans la littérature) ainsi qu'une expression réduite de Perforine et de Granzyme (Gzm) ^{51,207}. La virémie persistante chez ces individus est également associée à l'expression aberrante de récepteurs d'inhibition et de marqueurs d'activation ²⁰⁷. A l'inverse, les NK peuvent contribuer au phénotype des contrôleurs, à la fois en présence et en absence d'HLA protecteur ²⁰⁸⁻²¹⁰. Martin *et al* ont montré l'existence d'une interaction épistatique entre les gènes KIR3DS1 et HLA Bw4-80Ile dans le contexte de l'infection à VIH. L'association des deux allèles corrèle avec une charge virale et une diminution du taux de CD4 plus faible ainsi qu'une progression plus lente vers la maladie ²⁰⁹. La pertinence de cette observation a été validée dans une expérience *in vitro* où les NK d'individus avec le génotype KIR3DS1/HLA Bw4-80Ile montrent une production d'IFN γ , une cytotoxicité et une capacité supérieures à contrôler la réplication de VIH ²¹⁰. Une cohorte caucasienne d'EC a d'ailleurs montré un enrichissement significatif de ces deux allèles ^{211,212}. Très récemment Walker-Sperling *et al*

ont présenté le cas d'un individu ayant initialement contrôlé la charge virale sans traitement et qui, un an plus tard, a soudainement montré des signes de progression. Dans cette étude la progression est associée à une perte de la capacité des NK à inhiber la réplication virale ²¹³. Par ailleurs, il a été montré que les NK des PTC de la cohorte VISCONTI produisent des quantités d'IFN γ élevées (par comparaison avec des EC, VC ou patients sains) et démontrent une capacité supérieure à contrôler l'infection de LT CD4 autologues *in vitro* ²¹⁴. Ces données suggèrent que les NK peuvent jouer un rôle dans le contrôle de l'infection. Cette contribution n'est toutefois pas systématique au sein des EC et plusieurs études ont décrit les capacités suppressives des NK comme étant inférieures à celles des LT CD8 ²⁰⁸. Le rôle des NK a également été mis en avant dans un modèle simien. Le contrôle efficace de l'infection à SIV_{agm} par son hôte naturel le singe vert d'Afrique (AGM, *African Green Monkey*) dépend principalement des NK. La majorité des NK dans ce modèle de contrôle naturel sont CXCR5⁺ et ont la capacité de migrer et de persister dans les organes lymphoïdes secondaires. La déplétion des NK par un anticorps monoclonal anti-IL15 est associée à une augmentation de la réplication virale au sein des ganglions lymphatiques ²¹⁵. Les ganglions lymphatiques sont d'ailleurs un site majeur de réplication virale, aussi bien pour SIV que VIH-1, suggérant un rôle important des NK dans le contrôle de l'infection à SIV_{agm}.

2.5.4. La réponse non conventionnelle

Les lymphocytes $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$) constituent 5 % des LT de l'organisme et peuvent être divisés en deux sous-populations majeures : les V δ 1 et V δ 2. L'infection à VIH est associée à une expansion des V δ 1 se traduisant par une inversion du ratio normal V δ 2 : V δ 1 ^{216,217}. A partir de cette observation certains groupes font un parallèle avec l'inversion du ratio CD4 : CD8 provoqué par la déplétion des LT CD4 et l'expansion des LT CD8, suggérant par la même occasion un rôle des V δ 1 dans la réponse dirigée contre le virus. Un modèle de primate montrera quelques années plus tard que l'expansion des V δ 1 est une conséquence indirecte de l'infection, provoquée par la translocation de produits bactériens à travers la barrière intestinale vers le sang périphérique ²¹⁸. A l'inverse, les V δ 2 sont déplétés pendant l'infection, en particulier chez les individus avec une charge virale plus élevée ²¹⁹. L'inversion du ratio V δ 2 : V δ 1 provoqué par l'expansion des V δ 1 et la déplétion des V δ 2 intervient très tôt dans l'infection, typiquement pendant que le compte CD4 et le ratio CD4 : CD8 se situent toujours dans les valeurs normales ²²⁰. La cause exacte de la déplétion des V δ 2 n'est pas claire. Li et

Pauza ont proposé que gp120 puisse interagir avec CCR5 et l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ à la surface des V $\delta 2$, permettant l'activation des caspases via la voie de signalisation p38 et à terme l'apoptose ²²¹. Une autre hypothèse suggère que l'activation immunitaire pendant la primo-infection (due en partie à la translocation microbienne) active excessivement les V $\delta 2$ et induit leur apoptose.

Le rôle exact des LT $\gamma\delta$ est mal connu dans le contrôle naturel de l'infection. Plusieurs observations indépendantes ont toutefois montré que les LT $\gamma\delta$ sont présents en fréquence plus importante chez les EC et montrent une production supérieure d'IL-17 ^{222,223}. L'étude montre également que la fréquence de LT $\gamma\delta$ produisant de l'IL-17 corrèle négativement avec l'activation des LT CD8 et le niveau plasmatique de CD14 soluble (CD14s étant un marqueur non spécifique de l'activation des monocytes). Il a également été montré que des LT $\gamma\delta$ V $\delta 1$ sont capables, via NKG2A et NKG2C, de reconnaître et d'éliminer spécifiquement des LT CD4 infectés au travers du HLA-E ²²⁴. En 2018 Garrido *et al* ont apporté des éléments laissant penser que les LT $\gamma\delta$ peuvent être pertinents dans le contexte de la latence virale. Dans cette étude les V $\delta 2$ d'individus sous ART ont été expandus *ex vivo* avec une combinaison de pamidronate et d'IL-2 avant d'être co-cultivés avec des LT CD4 autologues infectés ou non. Les V $\delta 2$ ont montré une capacité d'inhibition de la réplication virale similaire aux LT CD8, et ont dégranulé seulement en présence de LT CD4 infectés. Ces mêmes cellules ont montré leur capacité à éliminer les cellules du réservoir réactivées par vorinostat dans un modèle rappelant le principe du *shock and kill* ²²⁵. Enfin, dans un modèle de primates, la présence de V $\delta 2$ endocervicaux avec un profil inflammatoire ont été négativement corrélés à la charge virale ²²⁶. Bien que limitées pour le moment, ces observations suggèrent un rôle potentiel des LT $\gamma\delta$ dans le contrôle de l'infection à VIH/SIV.

Une série d'articles publiés par le groupe de Louis Picker ont récemment changé notre perception de la réponse LT CD8 dans le contexte du contrôle efficace de l'infection à SIV. Certaines observations cliniques suggèrent que le VIH ou le SIV peuvent être vulnérables pendant les premières heures/jours de l'infection, avant que la réplication virale et l'établissement du réservoir ne puisse soutenir l'infection ^{176,227}. Pour tenter d'intercepter le virus pendant cette période de vulnérabilité, le groupe de Picker a développé un vaccin avec des vecteurs de CMV rhésus (RhCMV) exprimant des antigènes du SIV (RhCMV68-1). Une étude antérieure avait déjà montré la capacité du CMV d'induire des réponses LT CD8 persistante et de magnitude importante sur les potentiels sites d'entrée du SIV et du VIH ²²⁸.

D'une manière impressionnante la vaccination de rhésus macaques (RM) a permis d'éradiquer une souche hautement pathogénique du SIV chez 50 % des animaux après infection ²²⁹⁻²³¹. L'analyse de la réponse LT CD8 spécifique du SIV chez ces singes met en lumière un fait surprenant : les deux tiers sont restreints par le CMH-II et le tiers restant par le HLA-E. De plus, la protection chez ces animaux contre un challenge avec SIV_{mac239} est indépendante de la présence de LT CD8 classiques restreinte par le CMH-I. Le vecteur RhCMV qui a permis de générer la réponse LT CD8 non conventionnelle est la souche RhCMV68-1 contenant des délétions sur les gènes Rh157.5 et Rh157.4 (les orthologues des protéines UL128 et UL130 du CMV humain [HCMV]) ²³². D'une manière intéressante la vaccination avec un vecteur RhCMV contenant ces deux gènes (RhCMV68-1.2) génère une réponse LT CD8 classique restreinte par le CMH-I et abolit la protection des animaux contre SIV_{mac293}. Ainsi, l'éradication et la protection chez ces animaux sont partiellement sous la dépendance de réponses LT CD8 dites « non conventionnelles ».

2.5.5. La réponse humorale

Le rôle de la réponse humorale a longtemps été négligé dans le contrôle de l'infection à VIH en grande partie parce que les EC ont un titre d'anticorps neutralisants (NAb) inférieur aux progresseurs ²³³⁻²³⁵. De plus, si on divise les EC sur la base de la charge virale, les individus avec une charge virale très faible (< 1 copie/mL) montrent un titre NAb réduit avec un spectre de reconnaissance moins large ¹⁷¹. Chez les individus avec une charge virale détectable, le spectre de reconnaissance des NAb est directement corrélé avec la charge virale, la durée d'exposition au virus et la diversité virale ²³⁵⁻²³⁷. En d'autres termes, que ce soit pour les EC ou les progresseurs, la charge virale et la disponibilité en antigènes déterminent la magnitude et la capacité de neutralisation de la réponse humorale. Il est important de préciser que les EC sont hétérogènes au regard de la réponse humorale : certains ne montrent pas ou peu de neutralisation tandis que d'autres ont une capacité de neutralisation très large ^{235,238}. On parle alors d'anticorps neutralisants à large spectre (bNAb, *Broadly Neutralizing Antibodies*). Beaucoup d'efforts ont été fournis ces dernières années pour isoler et caractériser des bNAb agissant à basse concentration sur la majorité des souches virales. En 2013, deux études publiées dans Nature sur des modèles simiens montrent un déclin rapide de la virémie jusqu'à des niveaux indétectables après injection d'une nouvelle génération de bNAb. Dans un cas la combinaison de plusieurs anticorps a permis aux macaques infectés par SHIV

d'empêcher le rebond de la charge virale jusqu'à 5 semaines après interruption du traitement^{239,240}. L'un des bNAb utilisé dans ces études a été cloné à partir d'un lymphocyte B mémoire spécifique du VIH d'un EC, suggérant que ces individus ont la capacité de produire des bNAb très efficaces²³⁸. La pertinence in vivo de ces bNAb est sujet à débat. En effet, le virus se propage entre 100 et 1000 fois mieux par contact direct entre une cellule infectée et non-infectée plutôt que par des particules virales libres²⁴¹. Les travaux d'Abela *et al* ont montré que les bNAb parviennent à empêcher l'infection par les particules virales libres, mais ne bloquent pas la transmission directe de cellule à cellule²⁴². A l'inverse, Mahalanabis *et al* ont mis en évidence chez des EC la sélection de variants résistant à la neutralisation, suggérant un rôle de la réponse humorale dans le contrôle durable de l'infection²⁴³. Enfin, le groupe de Galit Alter a mis en avant la réponse polyfonctionnelle des EC, capable d'induire l'ADCC (*Antibody Dependent Cell Mediated Cytotoxicity*), de favoriser la phagocytose par les monocytes et les neutrophiles et d'activer le complément²⁴⁴. Dans cette étude la réponse anticorps des EC est dominée par IgG3 et IgG1, contrastant avec la réponse spécifique du virus des individus non contrôleurs dominée par IgG2 et IgG4.

2.5.6. La réponse cellulaire

Les LT CD4 ne sont pas simplement une cible pour le VIH, mais également un acteur efficace de l'immunité antivirale. Les LT CD4 des EC sont préservés en nombres et montrent des fonctions effectrices supérieures à leur équivalent chez les progresseurs et les patients traités. La réponse LT CD4 est notablement plus polyfonctionnelle chez les EC. Après stimulation par des peptides viraux les LT CD4 d'EC peuvent produire jusqu'à 7 cytokines/chemokines (IL-2, IFN γ , TNF α , GM-CSF, IP-10, MCP-3 et MIP-1 β) en quantité plus importante que les progresseurs²⁴⁵. Cette capacité n'est pas restreinte au sang périphérique puisque des résultats similaires ont été observés dans la muqueuse intestinale²⁴⁶. La muqueuse intestinale des EC est caractérisée par une fréquence plus importante de LT CD4 polyfonctionnels (capables de produire IL-2, IFN γ , TNF α et MIP-1 β) mais également par des réponses LT CD4 spécifiques de Gag de magnitude importante. Cette polyfonctionnalité des LT CD4 dans la muqueuse corrèle avec l'expression des HLA DRB1*13 et DQB1*06, déjà précédemment associée à la non-progression^{186,187,247,248}. D'une manière intéressante, la polyfonctionnalité des LT CD4 corrèle avec la magnitude de la réponse LT CD8 dans la muqueuse intestinale. À la vue de l'importance du GALT dans la

pathogénèse de l'infection à VIH, ces observations suggèrent un rôle important des LT CD4 dans le contrôle de l'infection. Parmi les cytokines produites par les LT CD4, IL-21 semble être particulièrement importante. Sa production est principalement sous la dépendance des *T follicular helper* (T_{FH}) et permet la régulation et la maintenance des réponses LT CD8, LB et NK ²⁴⁹. La progression vers la maladie est associée à une diminution d'IL-21 circulant et les EC maintiennent la capacité d'en produire aussi bien pendant la primo-infection que pendant la phase chronique ^{250,251}. Chevalier *et al* ont montré que la production d'IL-21 par les LT CD4 contribue au contrôle durable de l'infection en modulant la réponse LT CD8 spécifique du VIH. Spécifiquement, IL-21 augmente l'expression de perforine et le potentiel cytolytique des LT CD8 ²⁵².

Par ailleurs, les LT CD4 des EC montrent une résistance à l'apoptose induite par activation grâce à la régulation négative d'un facteur de transcription, FOXO3a, impliqué dans l'expression de gènes pro-apoptotiques ²⁵³. La résistance à l'apoptose peut être à l'avantage du virus dans certaines circonstances, notamment pour l'établissement du réservoir latent. Pourtant le réservoir des EC est distinct de celui des progressseurs à deux niveaux. D'abord par la taille, leur réservoir est plus petit. Ensuite par la composition, le réservoir des EC est composé principalement de T_{TD} et de T_{TM} disposant d'une durée de vie courte ^{176,254}. Cette observation est en décalage avec ce que l'on observe chez les progressseurs, qui au contraire, montrent une distribution biaisée vers les T_{CM} et T_{SCM} avec une durée de vie et un potentiel d'autorenouvellement important ²⁵⁵. Très récemment Claireaux *et al* ont proposé que les LT CD4 des EC sont relativement protégés de l'infection grâce à une expression réduite de CCR5, le co-récepteur d'entrée de VIH ²⁵⁶. Cette résistance à l'infection pourrait expliquer, conjointement avec l'efficacité de la réponse LT CD8, la taille réduite du réservoir chez les EC. Les auteurs suggèrent que l'interaction d'un TCR de haute avidité pour son antigène induit l'expression de β -chemokines qui en retour régule négativement l'expression de CCR5 ²⁵⁶.

En effet, l'une des caractéristiques des EC est l'existence d'une population LT CD4 spécifique du virus avec des TCR de haute avidité. Une étude a montré chez des EC l'existence de TCR capables de répondre à des concentrations minimales du peptide immunodominant de la capsid virale Gag293. Les LT CD4 spécifiques de Gag293 ont un répertoire $V\beta$ diversifié, suggérant que la réponse est soutenue par plusieurs clones de forte avidité ²⁵⁷. L'avidité est également associée à des propriétés fonctionnelles supérieures,

notamment la polyfonctionnalité et les capacités prolifératives. D'une manière intéressante, le transfert de TCR de haute avidité dans des lignées cellulaires ou des cellules CD4 primaires confère une sensibilité pour l'antigène et une polyfonctionnalité supérieure ²⁵⁸.

Pour conclure, la résistance à l'apoptose, la résistance à l'infection et la présence de TCR de haute avidité permettant une prolifération plus importante pourraient expliquer la capacité des EC à maintenir une réponse LT CD4 spécifique du virus. En effet, le VIH infecte préférentiellement les LT CD4 qui le ciblent ²⁵⁹. Par leur simple spécificité, les LT CD4 spécifiques du virus sont amenés à proximité immédiate des foyers de réplication virale et constituent une cible de choix pour le virus. C'est une observation importante car la réponse CD4 spécifique de Gag corrèle négativement avec la charge virale ²⁶⁰. Il est probable que la destruction préférentielle des LT CD4 spécifiques du virus chez les progressseurs compromet à la fois la capacité des LT CD4 de contrôler l'infection, mais également celle des autres compartiments immunitaires qui dépendent de l'aide des LT CD4, en particulier les LT CD8.

Partie 3 : Les lymphocytes T CD8

3.1. La thymopoïèse

Les lymphocytes T (LT) et B (LB) ont un progéniteur lymphoïde commun (CLP) issu de la moelle osseuse. Alors que les précurseurs des cellules B ont la capacité de murer sur place, les précurseurs des cellules T quittent la moelle osseuse et migrent vers le thymus. Cette dépendance vis-à-vis du thymus pour la maturation est la raison pour laquelle ces cellules sont appelées « thymus-dependent (T) cells » ou plus simplement « T cells » ²⁶¹. Lorsque les thymocytes accèdent au thymus pour la première fois via la jonction cortico-médullaire (CMJ), ils n'expriment aucun des marqueurs spécifiques d'une cellule T mature et les gènes du TCR sont toujours dans leur configuration basale ²⁶². Ces cellules n'expriment pas non plus les co-récepteurs CD8 et CD4, ils sont donc appelés thymocytes double négatifs (DN) ²⁶³. Les thymocytes ont besoin pour leur développement de signaux fournis par les cellules stromales du thymus, incluant les cellules épithéliales thymiques (TECs) et les fibroblastes mésenchymateux. Ces cellules coordonnent et régulent la survie, prolifération et différenciation des thymocytes principalement au travers de la production des cytokines IL-7, SCF (*Stem Cell Factor*) et DDL4 ^{264,265}. Les cellules stromales du thymus résident dans des compartiments thymiques différents, ce qui signifie que pour mener leur développement à terme, les thymocytes ont besoin de migrer à travers le thymus pour percevoir les différents signaux (Figure 10) ²⁶³.

Il est possible de suivre le développement des thymocytes au travers de l'expression coordonnée des marqueurs de surface CD44 (molécule d'adhésion) et CD25 (chaîne alpha du récepteur de l'interleukine 2). Les thymocytes vont dans un premier temps migrer depuis le cortex du thymus vers la zone sous-capsulaire tout en progressant à travers les stades de développement DN1 (CD44⁺ CD25⁻), DN2 (CD44⁺ CD25⁺) puis DN3 (CD44⁻ CD25⁺) ²⁶⁶. En parallèle les thymocytes prolifèrent massivement pendant la différenciation du stade DN1 vers DN3, ce processus est connu sous le nom de « prolifération pré-β » ^{267,268}. Lorsque les thymocytes parviennent à la région sous-capsulaire, la prolifération pré-β cesse. C'est à cette étape qu'intervient le réarrangement des gènes de la chaîne β du TCR dans un processus appelé β-selection. Lors de la β-selection les cellules capables de produire un réarrangement

productif perdent l'expression de CD25 tandis que celles qui échouent meurent par apoptose²⁶¹. La nouvelle chaîne β produite est exprimée à la surface de la cellule et s'associe avec une chaîne α temporaire : pré-T cell α (pT α). L'association forme un pré-complexe TCR qui une fois couplé avec la molécule CD3 permet d'obtenir les composants principaux de la signalisation TCR et oriente définitivement le développement des thymocytes vers la lignée α/β ^{261,263}. A l'inverse les thymocytes ayant réarrangé leurs gènes TCRD et TCRG s'engagent définitivement vers la lignée γ/δ . La stimulation du complexe pré-TCR/CD3 permet un second épisode de prolifération (appelé prolifération pré- α)²⁶⁹ et l'expression des co-

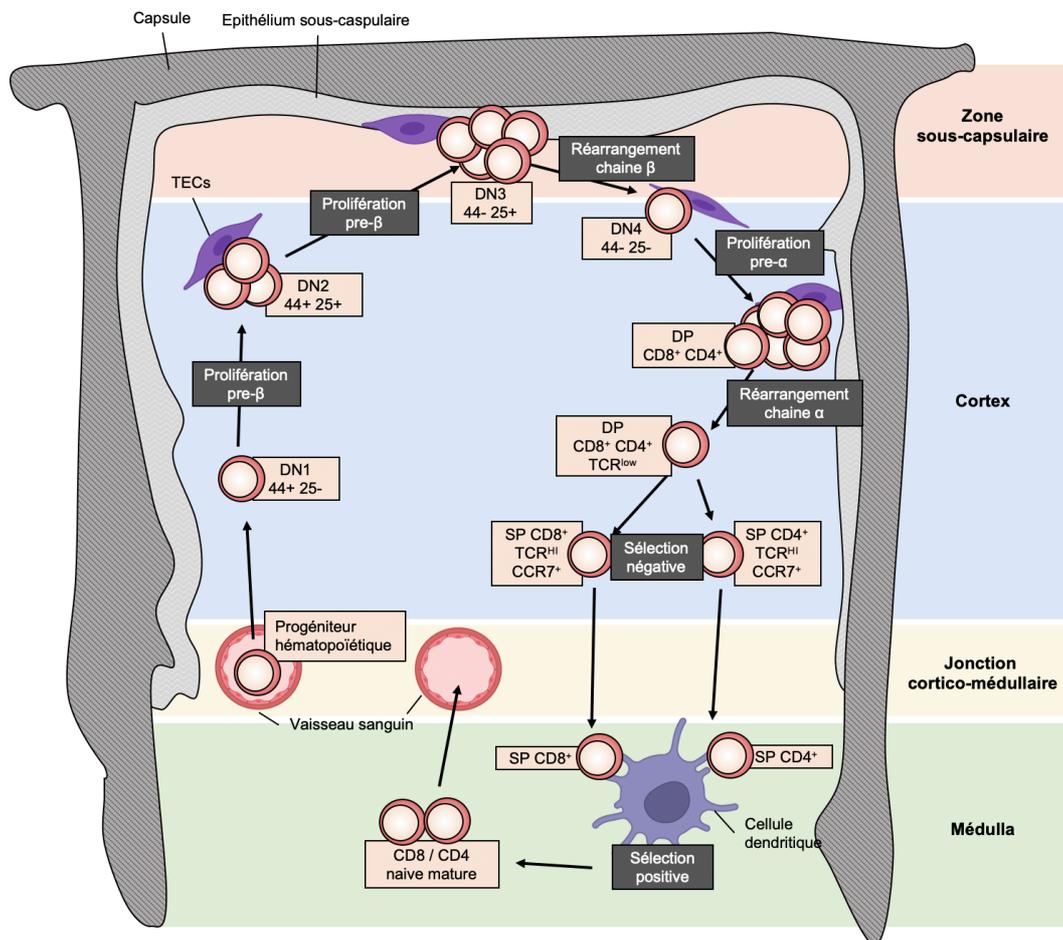


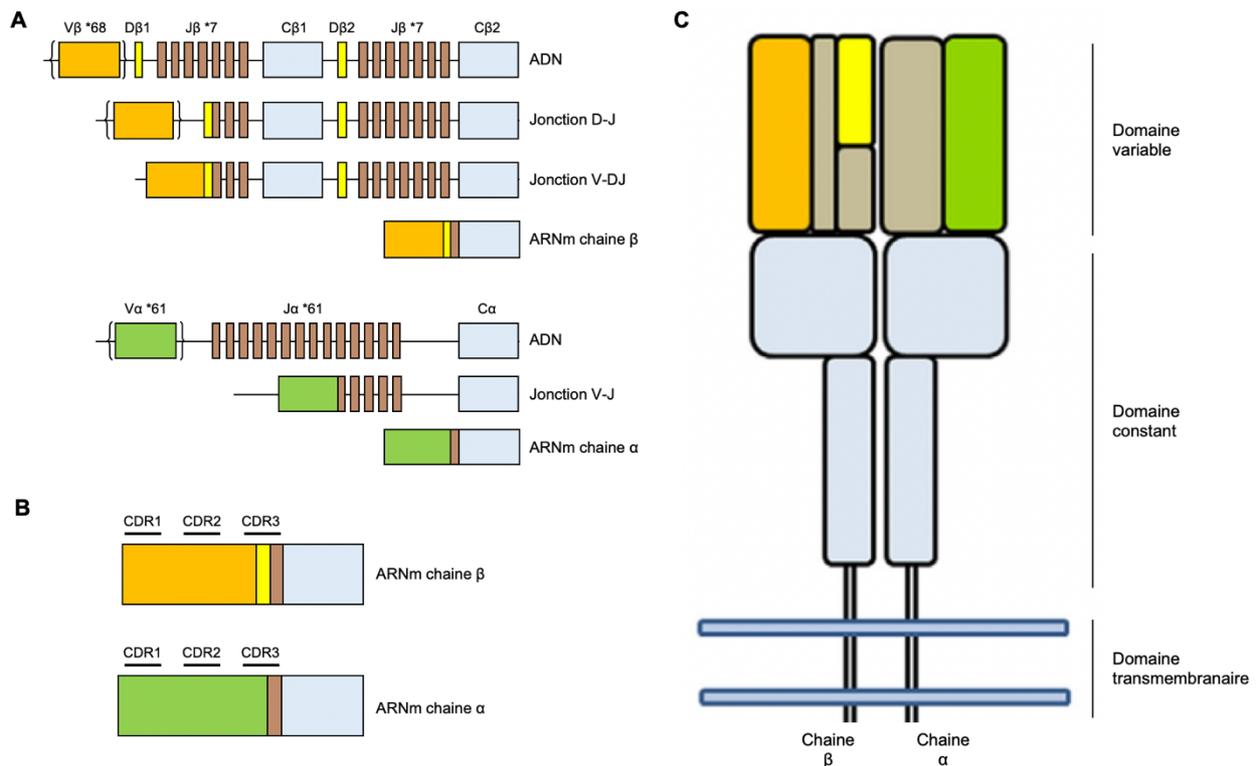
Figure 10 – Représentation schématique de la sélection thymique. Adapté de Förster et al et de Anderson et al. Après entrée dans le thymus via la jonction cortico-médullaire, les thymocytes doubles négatifs (DN) migrent à travers le thymus pour recevoir les signaux essentiels à leurs prolifération et différenciation. Les DN passent par les stades DN1 à DN3 en proliférant et en migrant vers la zone sous-capsulaire. Une fois sur site ils subissent le réarrangement des gènes de la chaîne β du TCR. Les thymocytes parvenant à produire à un réarrangement productif subissent un deuxième épisode de prolifération en migrant à nouveau vers le cortex. Une fois dans le cortex les thymocytes au stade DN4 subissent la sélection négative permettant de générer des thymocytes simples positifs (SP) CD8⁺ ou CD4⁺. Ces thymocytes SP migrent vers la médulla et subissent la sélection positive. Les cellules qui y parviennent des cellules naïves matures qui migrent alors vers la périphérie.

récepteurs CD4 et CD8 à la surface des thymocytes. Ce sont maintenant des thymocytes double-positifs (DP). Lorsque la prolifération pré- α cesse, les thymocytes DP commencent à réarranger les gènes de la chaîne α du TCR. D'une manière intéressante la structure du locus des gènes α autorise plusieurs tentatives de réarrangement. En conséquence la plupart des thymocytes DP parviennent à réarranger les gènes de la chaîne α et expriment à leur surface un TCR α/β ²⁶¹.

Chaque TCR $\alpha\beta$ formé dans chaque thymocyte est issu d'un processus aléatoire. Cela permet de créer un répertoire TCR avec une diversité unique, capable de reconnaître n'importe quel antigène. Le prix à payer pour cette approche est la création de TCR avec une spécificité inutile, incapables de reconnaître les CMH de classe I ou II, ou des TCR avec une spécificité trop grande pour le soi, pouvant être à l'origine de maladies auto-immunes une fois dans la périphérie. Pour pallier à ces problématiques, les thymocytes DP subissent des sélections dites « positives » puis « négatives » ²⁷⁰. Lorsque le réarrangement de la chaîne α est terminé, les thymocytes subissent la sélection positive ²⁶³. A ce stade la plupart des thymocytes DP expriment des niveaux très faibles du TCR ²⁶¹. Les TECs présentent des antigènes au travers du CMH et les thymocytes DP qui ne parviennent pas à reconnaître le complexe CMH-antigène meurent par apoptose. Les cellules qui y parviennent reçoivent des signaux de survie et expriment une quantité accrue de TCR à leur surface ²⁶¹. Ces cellules se différencient ensuite en thymocytes simple-positifs (SP) CD4+ ou CD8+ en fonction de leur affinité pour le CMH de classe I ou II ²⁷¹. Les thymocytes sélectionnés expriment à leur surface CCR7 qui leur permet de migrer dans la médulla ou les ligands de CCR7 (CCL19 et CCL21) sont produits par les TECs ^{270,272}. Dans la médulla les thymocytes SP subissent la sélection négative en interagissant avec des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (DCs ou macrophages) présentant des antigènes du soi. Les thymocytes interagissant trop fortement sont éliminés par apoptose, permettant ainsi d'éliminer les cellules autoréactives ²⁷³. Une énorme majorité des thymocytes échoue à la double sélection et meurent par apoptose dans le thymus. Les cellules qui y parviennent sont des LT CD8 et CD4 naïfs matures, dont le TCR est capable de reconnaître des antigènes étrangers à l'organisme présentés par les CMH de classe I et II respectivement. Ces cellules quittent alors le thymus vers la périphérie à la recherche de leur antigène respectif.

3.2. Le récepteur des cellules T

Le TCR est un récepteur de surface exprimé à la surface de tous les lymphocytes T. Le TCR des LT CD8 est composé d'un couple de chaînes polypeptidiques α/β capable de reconnaître et de se fixer spécifiquement à un antigène présenté par le CMH de classe I (CMH-I) à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène (CPA) ou d'une cellule infectée. Chaque TCR distinct est porteur d'une spécificité unique. Ainsi la population CD8 peut être divisée en sous-populations appelées « clonotype » en fonction de la spécificité du TCR. La somme de ces différents TCR (ou clonotypes) constitue le répertoire TCR. La spécificité du TCR est confinée à des régions du récepteur appelées CDR pour *complementary determining region*. Les régions CDR correspondent aux parties du TCR qui interagissent avec le complexe peptide/CMH-I (pCMH-I). Le TCR α/β utilise 6 régions CDR ultra variables dont 3 situées sur la chaîne α et 3 sur la chaîne β . Chaque chaîne possède ainsi trois régions CDR appelées CDR1, CDR2 et CDR3 ²⁷⁴. Bien qu'en théorie les 3 régions CDRs interagissent avec le pCMH-I, la région CDR3 est particulièrement importante. Il s'agit du CDR avec la plus



grosse variabilité et c'est cette région des chaînes α et β qui est classiquement séquencée pour définir la clonalité d'une cellule T (Figure 11 B&C)²⁷⁵. Puisque l'organisme ne peut pas prévoir la nature des antigènes dérivés de pathogènes qui lui seront présentés, il est important qu'il dispose d'un répertoire diversifié capable de reconnaître une multitude d'antigènes distincts. Cette diversité est possible grâce à un processus de recombinaison somatique appelé recombinaison VDJ.

3.2.1. La recombinaison VDJ

La recombinaison VDJ est le processus par lequel des segments géniques appelés V (Variable), D (Domaine), J (Jonction) et C (Constant) sont assemblés pour former un exon unique codant pour la région du TCR reconnaissant l'antigène²⁷⁶. Chaque recombinaison a le potentiel d'utiliser des gènes différents parmi de nombreux gènes V, D, J et C possibles. Des recombinaisons faisant intervenir des gènes différents génèrent des TCR avec une spécificité distincte. Il existe 68 domaines V, 2 domaines D, 14 domaines J et 2 domaines C pour la chaîne β et 61 domaines V, 61 domaines J et 1 domaine C pour la chaîne α (la chaîne α ne contient pas de domaine D) (Figure 11A).

Tous les gènes V, D, J ou C sont bordés par une séquence appelée RSS pour *Recombination Signal Sequence*. La séquence RSS contient un motif heptamérique adjacent à la partie codante du gène et un motif nonamérique situé à l'autre extrémité. Ces deux motifs sont séparés par une région d'une taille de 12 ou 23 paires de bases. En fonction de la taille de cette portion d'ADN intercalante, le RSS est appelé RSS-12 ou RSS-23. La première étape de la recombinaison est la reconnaissance par les enzymes RAG1 et RAG2 de deux séquences RSS de deux gènes du TCR distincts (Figure 12, étape 1). La recombinaison n'intervient qu'entre deux gènes avec des séquences RSS de taille différente, c'est la règle 12/23. Les protéines HMG permettent la formation d'une synapse en rapprochant les deux séquences RSS l'une de l'autre (Figure 12, étape 2). Les recombinases RAG1 et RAG2 catalysent alors des coupures de l'ADN double brin entre les régions heptamériques du RSS et les parties codantes des 2 gènes impliqués (Figure 12, étape 3). Les extrémités qui correspondent aux parties codantes des gènes du TCR sont jointes de manière covalente (Figure 12, étape 4). Ce processus est souvent associé à des délétions ou additions aléatoires de nucléotides au niveau de la jonction entre les deux gènes. L'enzyme terminal deoxynucleotidyl tranferase (Tdt)

ajoute en moyenne 2 à 3 nucléotides sur les extrémités 3' générées et au moins 70% des recombinaisons VDJ contiennent une addition de nucléotides à la séquence²⁷⁷. En parallèle, la coupure de l'ADN par les enzymes RAG génère également un segment d'ADN comprenant la portion d'ADN situé entre les deux gènes réarrangés. Cette portion est délimitée à ses deux extrémités par les séquences RSS. La liaison covalente des séquences RSS génère un épisode circulaire appelé TREC (*T-cell Receptor Excision Circle*) (Figure 12, étape 4). Les TRECs sont des produits secondaires stables de la recombinaison VDJ qui ne sont pas dupliqués pendant la mitose. Ils sont donc progressivement « dilués » au fur et à mesure des cycles cellulaires. La présence de TRECs permet de détecter les cellules naïves ayant récemment quitté le thymus et permet ainsi d'évaluer la production thymique²⁷⁸. Pour la chaîne β ce processus est répété deux fois. Une première fois pour lier un gène D avec un gène J et une seconde fois pour joindre un gène V à la portion DJ créée précédemment. La chaîne α ne contient pas de domaine D, la recombinaison est donc faite une seule fois entre les gènes V et J (Figure 11A).

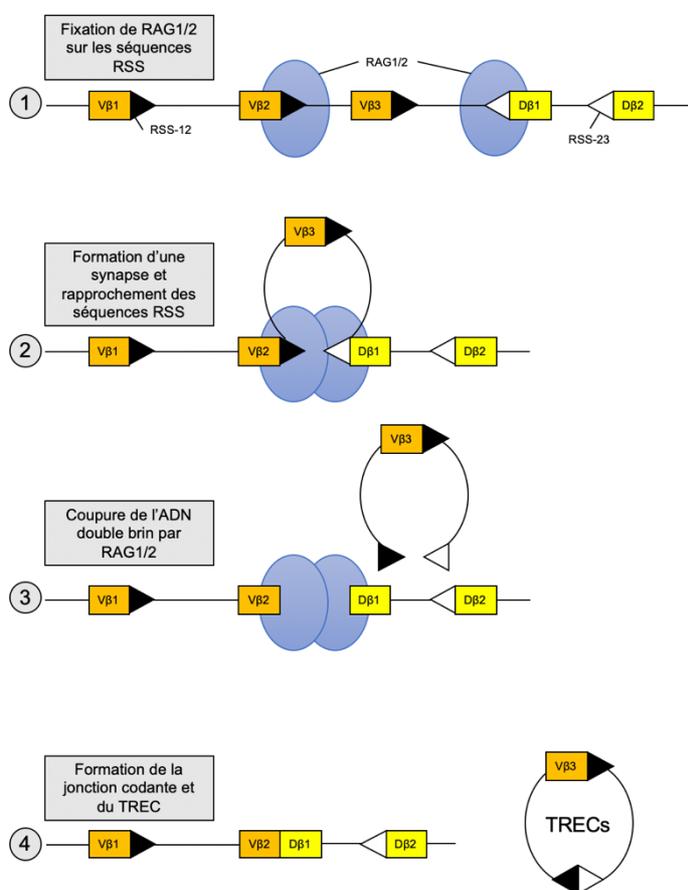


Figure 12 - Étapes clés de la recombinaison VDJ. Étape 1 – Fixation de RAG1/2 sur les séquences RSS de deux gènes du TCR à réarranger. Étape 2 – Formation d'une synapse rapprochant les deux séquences RSS l'une de l'autre. Étape 3 – RAG1/2 coupe l'ADN entre la séquence heptamérique du RSS et la partie codante du gène du TCR. Étape 4 – Les extrémités libres des gènes du TCR sont jointes de manière covalente et un TREC est formé.

3.2.2. La diversité du TCR

La diversité générée par la recombinaison VDJ a plusieurs origines. D'abord une diversité *combinatoire*, chaque recombinaison a le potentiel d'utiliser des gènes différents parmi de nombreux gènes V, D, J et C possibles, et donc de générer des TCR avec des spécificités distinctes. Ensuite, une diversité *jonctionnelle* : le réarrangement de deux gènes est accompagné d'addition ou de délétion aléatoire de nucléotides au niveau de la jonction. La diversité jonctionnelle est un facteur important pour assurer la diversité globale du répertoire. Les travaux de Cabaniols *et al* et de Gilfilan *et al* ont montré que des souris avec une mutation dans le gène de la Tdt (enzyme responsable de l'addition de nucléotides pendant la recombinaison) présentaient un répertoire TCR réduit ^{277,279}. Enfin, une diversité *d'appariement* : il existe plusieurs possibilités d'appariement des chaînes α et β à la surface de la cellule. Il a été montré que des lymphocytes partageant la même chaîne β pouvaient exprimer des chaînes α différentes. Cela suggère qu'une chaîne β est capable de s'apparier à plusieurs chaînes α distinctes, générant ainsi des cellules avec des spécificités uniques.

En prenant ces principes en compte, la diversité théorique générée par la recombinaison VDJ est énorme : 1.10^{15} TCR α/β différents peuvent être formés. Cette valeur correspond au répertoire TCR avant sélection dans le thymus et ne correspond pas à la nature du répertoire T dans la périphérie. Lorsque la sélection thymique est prise en compte, la valeur haute de la diversité du répertoire est de 1.10^{13} ²⁸⁰. Par comparaison on estime à 1.10^{12} le nombre moyen de cellules T chez l'Homme ²⁸¹ ! Bien entendu il est impossible que la diversité du répertoire excède le nombre de lymphocytes chez un individu donné. Cette estimation est en réalité une valeur indicative du répertoire potentiel d'un individu. Ce décalage entre la diversité potentielle et la limite imposée par le nombre de cellules T dans le corps indique que le répertoire potentiel est bien plus grand que le répertoire exprimé chez un individu à un moment donné. C'est la raison pour laquelle deux individus génétiquement identiques peuvent présenter des répertoires très différents l'un de l'autre. Lin et Welsh ont ainsi établi que des souris génétiquement identiques, soumises à la même infection virale (LCMV en l'occurrence), montrent des réponses spécifiques du virus avec des TCR remarquablement distincts ²⁸². Une estimation plus prudente de la diversité T donne le chiffre de 10^8 TCR distincts dans le compartiment naïf circulant ²⁸¹.

En plus de compter sur un répertoire TCR extrêmement divers, chaque TCR est capable de reconnaître jusqu'à 1.10^6 couples p/CMH-I différents. Cette capacité est appelée réactivité croisée (ou *cross-reactivity*)²⁸³. A titre d'exemple, le TCR 1E6 a été récemment isolé chez un individu avec un diabète de type 1. En plus de reconnaître le résidu 15-24 de la molécule de pré-pro-insuline, ce TCR est également capable de reconnaître plus de 1,3 million de 10-mer^{284,285}. D'une manière intéressante les peptides reconnus ne montrent pas forcément une forte homologie de séquence. Le TCR 1E6 a montré une avidité fonctionnelle 100 fois supérieure pour le peptide RQFGPDFPTI alors que ce dernier diffère du peptide wild-type de la pré-pro-insuline (ALWGPDPA) sur 7 des 10 acides aminés. Ainsi la spécificité du TCR ne correspond pas à un modèle « un clonotype, une spécificité » mais, au contraire, à « un clonotype, un éventail de spécificités ». La réactivité croisée couplée avec un répertoire TCR très divers permet à la réponse T de reconnaître spécifiquement la quasi-totalité des couples pCMH-I possibles.

3.2.3. Le complexe TCR

Une cellule LT CD8 exprime en moyenne entre 30 000 et 100 000 molécules de TCR à sa surface^{286,287}. Sur la membrane plasmique le TCR est associé de manière non covalente avec la molécule CD3 composée de 5 chaînes polypeptidiques γ , δ , ϵ , η et ζ . L'ensemble forme le complexe TCR (Figure 13). Toutes les sous-unités de la molécule CD3 présentent des motifs de transduction de signaux, appelés ITAM (*Immune Receptor Tyrosine-based Activation Motif*), et permettent la propagation du signal d'activation. Il existe un motif ITAM sur les sous-unités γ , δ et ϵ et trois sur ζ . Cet aspect de la biologie des LT CD8 est développé dans la partie « *La signalisation du TCR post-activation* ».

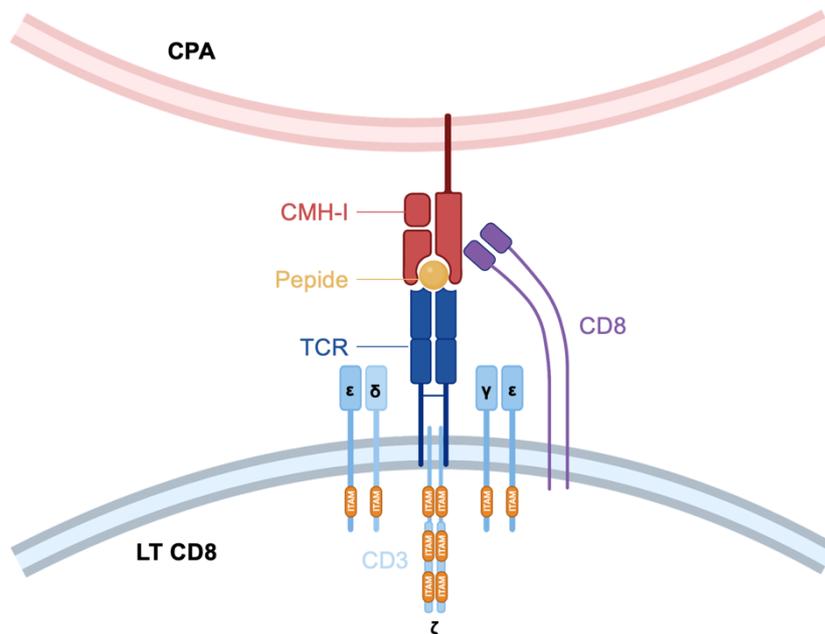


Figure 13 - Structure du complexe TCR en interaction avec un complexe peptide/CMH-I. Le TCR (bleu foncé) reconnaît un antigène présenté par le CMH de classe I (rouge). L'interaction entre les deux molécules est stabilisée par la molécule CD8 (violet). Le complexe CD3 formé des 5 chaînes γ , δ , ϵ , η et ζ permet la transduction du signal d'activation au travers des ITAMs (orange) présent sur toutes les chaînes.

3.2.4. Affinité, avidité et avidité fonctionnelle

L'affinité, l'avidité et l'avidité fonctionnelle sont les paramètres qui gouvernent la reconnaissance du complexe pCMH-I par le TCR. L'affinité est définie comme la force de l'interaction entre un seul TCR et un seul ligand pCMH-I. Elle est décrite par les constantes de dissociation (K_{off}) et d'association (K_{on}), toutes deux représentées par la constante de dissociation d'équilibre (K_D) (Figure 14 – 1). Si l'affinité définit l'interaction entre un TCR et un ligand pCMH-I, l'avidité prend en compte l'engagement de plusieurs TCR et pCMH-I ainsi que d'autres molécules (notamment le co-récepteur CD8) (Figure 14 – 2). Enfin, l'avidité fonctionnelle représente l'activité et les fonctions effectrices du LT CD8 à différentes concentrations du peptide spécifique. L'avidité fonctionnelle est classiquement décrite sous forme de concentration efficace 50 (EC50), représentant la dose à laquelle on observe l'activation maximale de la moitié de la population T CD8 (Figure 14 – 3). *In vitro* l'avidité fonctionnelle varie entre 1 et 100 μM ²⁸⁸. Les LT CD8 avec une haute avidité fonctionnelle sont capables de répondre à de faibles doses de peptide tandis que les cellules avec une faible avidité fonctionnelle nécessitent une quantité d'antigène supérieure pour afficher les mêmes fonctions effectrices. Cette mesure *in vitro* est un bon outil pour évaluer l'efficacité *in vivo* de la réponse T CD8 ²⁸⁹. L'avidité fonctionnelle est un critère important notamment dans le contexte de certaines infections virales et du cancer. Les épitopes de

cellules cancéreuses sont souvent exprimés en faible quantité et le facteur Nef de VIH-1 limite l'expression du CMH-I à la surface. Une avidité fonctionnelle importante est donc nécessaire pour reconnaître et lyser spécifiquement les cellules infectées/tumorales exprimant relativement peu d'antigènes.

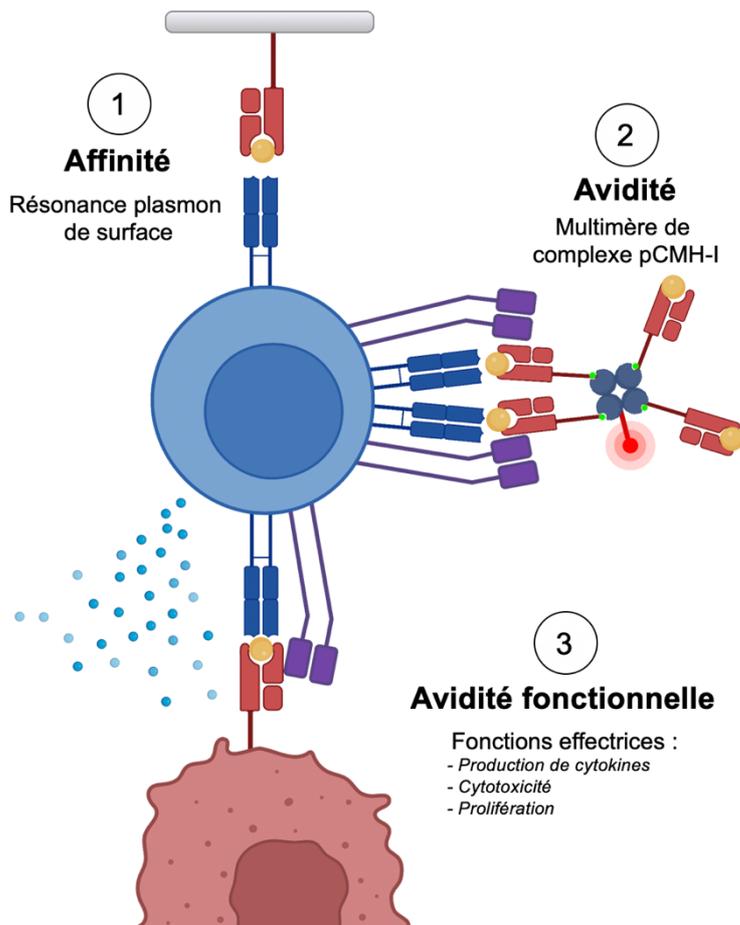


Figure 14 - Paramètres descriptifs du TCR. Illustration de l'affinité (1), Avidité (2) et Avidité Fonctionnelle (3). Adapté de Campillo-Davo et al.

3.3. Activation des LT CD8

La recombinaison VDJ puis la maturation thymique permet de générer des LT CD8 naïfs avec un TCR capable de reconnaître des antigènes du non-soi. Après la sortie du thymus les LT CD8 naïfs circulent dans la périphérie à la recherche de leur antigène spécifique. Compte tenu de la rareté de précurseurs naïfs spécifiques d'un antigène donné, il est peu probable qu'une rencontre fortuite intervienne. Pour pallier à ce problème, l'antigène est enrichi dans les organes lymphoïdes secondaires grâce aux CPAs qui le capturent, l'internalisent et le présentent à leurs surfaces au travers du CMH-I. Les LT CD8 naïfs ont la capacité de migrer sur le site de présentation antigénique grâce au récepteur de chemokine

CCR7²⁷². Une fois sur place les LT CD8 naïfs avec le TCR adéquat reconnaissent le complexe peptide CMH-I ce qui permet leur activation, prolifération et acquisition de fonctions effectrices.

3.3.1. Formation de la synapse immunologique

La synapse immunologique (SI) est l'interface entre la cellule CD8 et la CPA (souvent une DC). Le rôle de la SI est de faciliter la signalisation du TCR en concentrant sur une même zone le TCR, les complexes pCMH, ainsi que les molécules de signalisation permettant la propagation et l'amplification du signal d'activation²⁹⁰. La SI se forme quelques minutes après l'interaction entre la CPA et la cellule CD8²⁹¹. Les cellules T circulantes sont circulaires, non polarisées, avec une distribution homogène des récepteurs membranaires à leurs surfaces. Pour faciliter la création de la SI, la cellule CD8 doit co-localiser les acteurs moléculaires impliqués dans la formation de la synapse. Ce processus est appelé polarisation. La polarisation est provoquée par l'attachement de chemokines à leur récepteur spécifique à la surface de la cellule CD8²⁹². La cellule CD8 rencontre un gradient croissant de chemokines lors de son arrivée sur le site de présentation antigénique et commence donc la polarisation avant même de rencontrer la CPA. Cela permet de faciliter l'adhésion, l'engagement du TCR et la formation de la SI. L'engagement du TCR avec le complexe pCMH-I permet une réorganisation du cytosquelette autour de la SI²⁹³. L'architecture de la SI est alors modifiée pour faciliter l'interaction entre la cellule CD8 et la CPA. La SI mature est formée d'anneaux concentriques appelés clusters d'activation supramoléculaire centrale (c-SMAC), clusters d'activation supramoléculaire périphérique (p-SMAC) et clusters d'activation supramoléculaire distale (d-SMAC). La zone centrale c-SMAC est enrichie en complexe TCR/pCMH-I stabilisé par le co-récepteur CD8, la zone périphérique p-SMAC contient des molécules d'adhésion (LFA-1 notamment) et la zone distale contient les molécules à fort encombrement stérique qui pourraient gêner l'interaction CD8-APC (CD45 et CD43 par exemple) (Figure 15)^{290,294}.

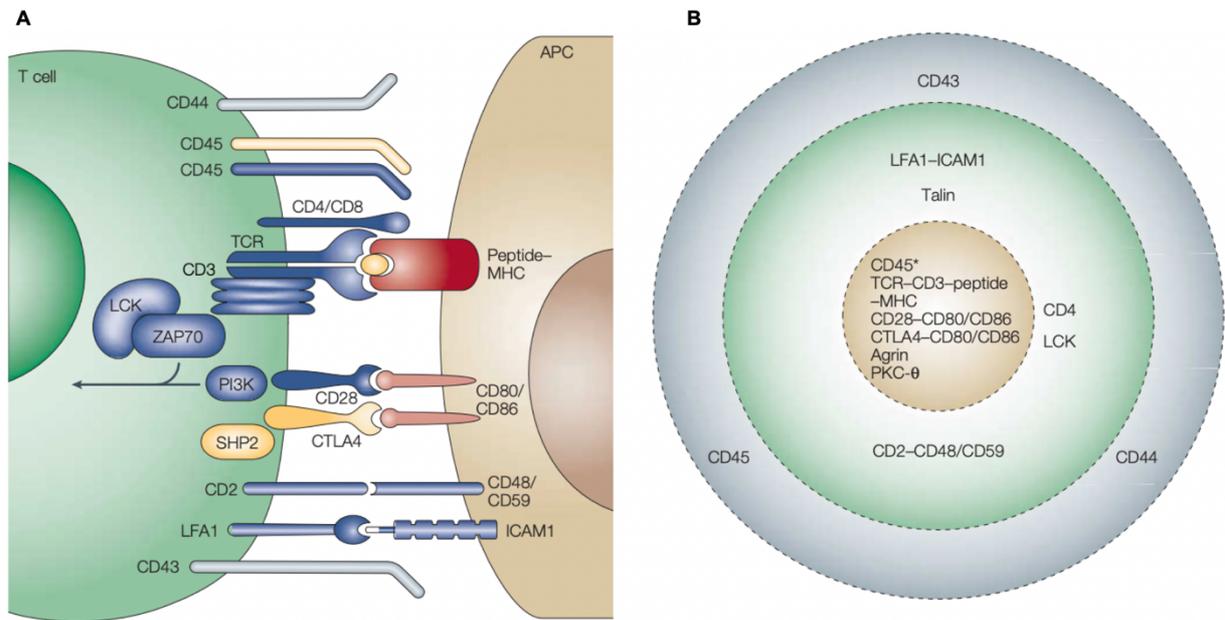


Figure 15 - Synapse immunologique (SI). Représentation d'un SI vue de côté (A) et du dessus (B) Huppa & Davis. Les composants essentiels de la synapse immunologique sont indiqués. Les molécules stimulatrices/molécules du CMH sont indiquées en rouge, les molécules d'activation et de costimulation sont indiquées en bleu, les molécules inhibitrices sont indiquées en jaune et les molécules non impliquées sont indiquées en gris.

3.3.2. Les signaux 1, 2 et 3

Signal 1 – Stimulation antigénique par le TCR.

La force du signal 1 dépend de 3 facteurs : la charge antigénique, le nombre de TCR engagé dans la SI et l'affinité du TCR pour le complexe pCMH-I. En modulant l'expression d'un épitope de vaccinia à la surface de cellules infectées, Wherry *et al* ont montré que la prolifération des LT CD8 est directement proportionnelle à la quantité d'antigène présentée²⁹⁵. De plus, la présence d'un TCR de forte affinité et/ou d'une quantité importante d'antigène peut accélérer l'initiation de la prolifération. Une fois initié, le cycle cellulaire progresse à la même vitesse indépendamment de l'affinité du TCR pour l'antigène²⁹⁶. En revanche, l'affinité du TCR module l'amplitude de la prolifération et la survie des LT CD8. Si les LT CD8 avec un TCR de faible affinité sont capables de s'activer et de former des réponses effectrices et mémoires fonctionnelles, les cellules avec un TCR de haute affinité (ayant reçu un signal fort) prolifèrent de manière intense et subissent la contraction plus tard²⁹⁷. De plus,

Hommel et Hodgkin ont démontré que les cellules avec un TCR de faible affinité sont plus sensibles à l'apoptose entre chaque cycle cellulaire. Les auteurs ont ainsi noté qu'une augmentation de 20 % de l'apoptose induit une diminution d'un facteur 9 du nombre de cellules après 10 cycles de division cellulaire²⁹⁶. Cela suggère que les LT CD8 avec un TCR de haute affinité reçoivent des signaux de survie plus importants. La prolifération supérieure et la résistance à la mort cellulaire sont deux mécanismes par lesquels la réponse immune limite la compétition inter-clonale et sélectionne les clones de haute affinité pour l'antigène.

Signal 2 – Stimulation par les récepteurs costimulateurs exprimés à la surface de la cellule T.

Les récepteurs costimulateurs n'induisent pas l'activation de la cellule T par eux-mêmes. Ils fonctionnent comme le « rhéostat » de la réponse T en fournissant des signaux activateurs ou inhibiteurs après interaction avec leurs ligands respectifs. L'absence de signaux costimulateurs après stimulation du TCR peut induire l'anergie ou l'apoptose des LT CD8. Les récepteurs costimulateurs sont classiquement séparés en deux groupes : les molécules homologues à CD28 et les membres de la superfamille des récepteurs TNF (TNFR)²⁹⁸. Parmi les molécules homologues à CD28, le récepteur costimulateur CD28 est le plus étudié. L'interaction de CD28 avec ses ligands (CD80 et CD86) à la surface des CPA permet de diminuer le seuil d'activation de la cellule T et de fournir des signaux de survie²⁹⁹. De manière similaire, *inducible costimulator* (ICOS) fournit des signaux permettant l'activation et la différenciation de la cellule T après interaction avec son ligand ICOS-L³⁰⁰. En plus de récepteurs costimulateurs (CD28 et ICOS), les molécules homologues à CD28 comprennent également des récepteurs co-inhibiteurs. Il en existe trois : PD-1, CTLA-4 et BTLA. Ces molécules sont impliquées dans la tolérance et permettent d'atténuer la réponse immunitaire en fournissant des signaux inhibiteurs. CTLA-4 interagit notamment avec les ligands de CD28 pour antagoniser l'action de ce dernier³⁰¹. Les membres majeurs de la superfamille des TNFR incluent OX40, CD27, 4-1BB, CD30, GITR et HVEM avec leurs ligands respectifs OX40L, CD70, 4-1BBL, CD30L, GITRL et Light²⁹⁸.

Signal 3 – Stimulation par des cytokines pro-inflammatoires.

La signalisation TCR (signal 1) et les récepteurs costimulateurs (signal 2) sont suffisants pour initier la prolifération d'une cellule CD8 naïve. En revanche, en l'absence de signaux cytokiniques spécifiques, la cellule CD8 échoue à développer des fonctions effectrices

optimales, montre une capacité de survie réduite et ne parvient pas à former une population mémoire fonctionnelle ³⁰². Puisque ce signal est requis en complément de la signalisation TCR et des récepteurs costimulateurs, il a été appelé signal 3. Des études récentes ont montré que l'IL-12 et l'IFN de type I (α/β) sont les deux sources principales pour le signal 3 dans plusieurs contextes distincts (cancer, infection virale, etc.) ³⁰²⁻³⁰⁴. Ces cytokines permettent un remodelage chromatinien à l'origine de la transcription de gènes impliqués dans la différenciation, l'acquisition de fonctions effectrices et la formation d'une réponse mémoire. D'une manière intéressante il a été montré que la nature des cytokines impliquées diffère entre les CD8 et les CD4. Curtsinger *et al* ont démontré que les CD8 naïves nécessitent de l'IL-12 pour la prolifération tandis que les CD4 naïves ont besoin d'IL-1 ³⁰⁴.

3.3.3. La signalisation du TCR post-activation

L'activation de la cellule T dépend d'une cascade signalétique intervenant en aval des signaux 1 et 2 (Figure 16). Lors de la formation de la SI, le co-récepteur CD8 co-localise avec le TCR pour stabiliser l'interaction pCMH-I/TCR. Ceci permet à la tyrosine kinase Lck, fixée au domaine intracellulaire de la molécule CD8, d'être recrutée au niveau du complexe TCR. Le rôle de Lck est de phosphoryler des motifs appelés ITAMs (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) ³⁰⁵. Il s'agit de séquences conservées de 4 acides aminés répétés dans les queues cytoplasmiques de protéines transmembranaires. On trouve des ITAMs dans le complexe TCR sur les domaines cytoplasmiques de CD3 et de la chaîne ζ . La phosphorylation des ITAMs par Lck permet l'attachement d'une autre protéine kinase appelée ZAP70. Une fois ZAP70 recruté au niveau des ITAMs la protéine est également phosphorylée par Lck ce qui permet son activation. La forme activée de ZAP70 phosphoryle alors la protéine transmembranaire LAT (*transmembrane adaptor Linker for Activation of T cells*) et permet le recrutement de molécules adaptatrices (GRAP2, GRB2, SLP76, ADAP et NCK1) et de molécules de signalisation (PLC γ 1, ITK et VAV1) ^{306,307}. L'ensemble forme un complexe multimoléculaire appelé signalosome LAT. Les molécules impliquées dans le signalosome LAT ont de multiples cibles cytoplasmiques permettant la propagation et l'amplification du signal d'activation. Par exemple, VAV1 induit une réorganisation du cytosquelette en activant RAC et CDC42 tandis que PLC γ 1 catalyse la production d'un second message impliqué dans la libération de calcium intracellulaire et l'activation des MAPK (*mitogen-activated protein kinases*), de la PKC (protein kinase C) et de la calcineurine ³⁰⁶. RAC, CDC42, PKC, MAPK et

la calcineurine permettent la propagation du signal par des mécanismes distincts. A terme, ils vont chacun induire l'activation et/ou la translocation de facteurs de transcription vers le noyau permettant d'initier ainsi un programme de transcription soutenant la prolifération, l'acquisition de fonctions effectrices et la différenciation.

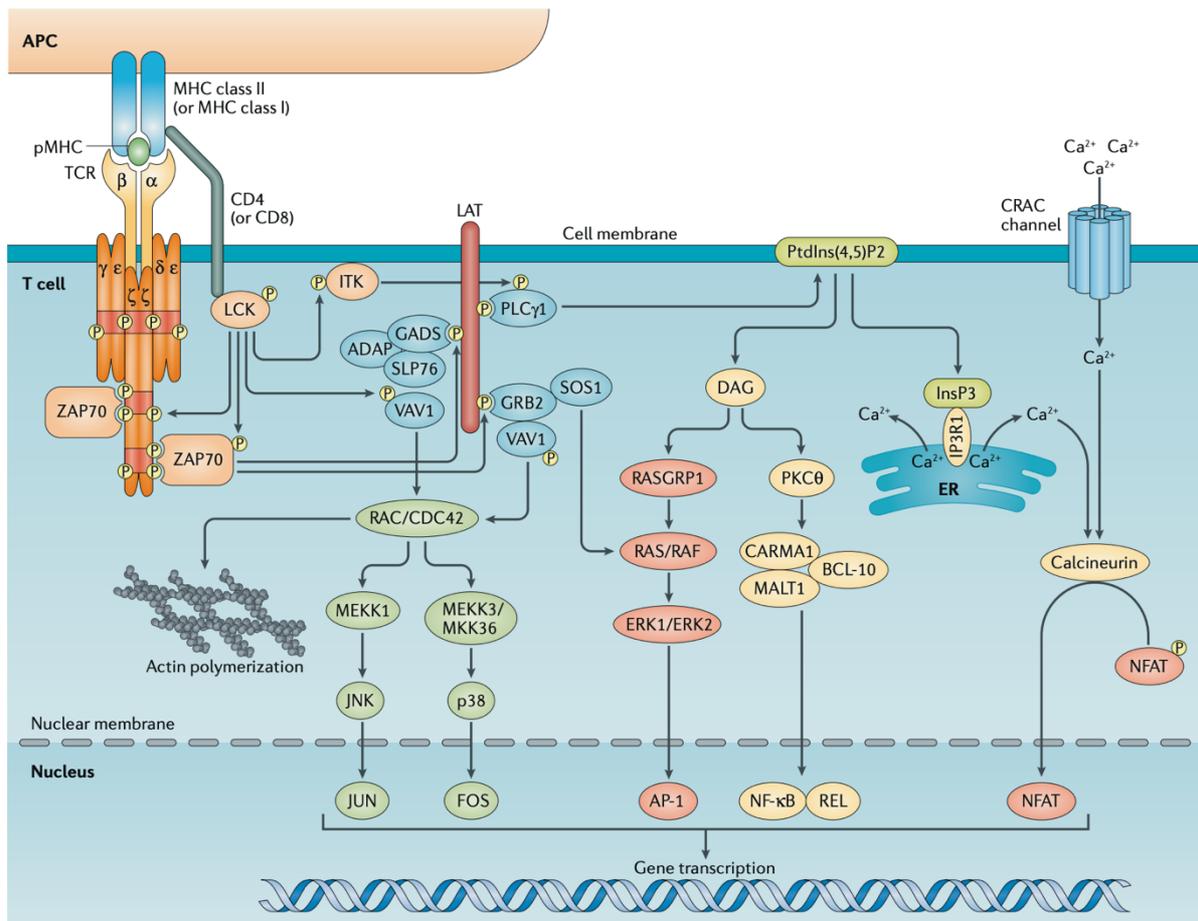


Figure 16 - Principales voies de signalisation impliquées dans l'activation post-TCR. Gaud et al. La signalisation TCR est initialement déclenchée par l'attachement du TCR à un complexe peptide CMH-I. La colocalisation de la molécule CD8 vers la synapse immunologique permet de rapprocher la protéine Lck des ITAMs du complexe CD3 pour permettre leur phosphorylation. La phosphorylation des ITAMs permet alors le recrutement de la protéine ZAP70 qui sera à son tour phosphorylée par Lck. La forme activée de ZAP70 peut alors induire la phosphorylation du complexe LAT permettant la formation du signalosome LAT. Le signalosome LAT permet alors la transduction et l'amplification du signal d'activation au travers de multiples cibles cytoplasmique.

3.4. Prolifération des lymphocytes T CD8

Après avoir reçu les signaux d'activation les LT CD8 entament une prolifération et une expansion clonale intense. Les données de Badovinac *et al* suggèrent qu'une cellule CD8 naïve peut se diviser jusqu'à 19 fois en une semaine, à raison de 4 à 6 heures par cycle. Cela représente une expansion d'un facteur 500 000 à partir d'une seule cellule. Pour soutenir cette prolifération, la cellule naïve subit des changements métaboliques drastiques permettant de fournir l'énergie et les substrats métaboliques nécessaires. L'activation est accompagnée d'une augmentation du métabolisme mitochondrial et d'une consommation plus importante d'oxygène ³⁰⁸. Mais la modification la plus importante concerne le métabolisme du glucose. Après activation la glycolyse devient la source énergétique principale ³⁰⁹. Le passage à un métabolisme glycolytique permet, d'une part de stimuler la voie des pentoses phosphates dont les produits intermédiaires (ribose-5-phosphate et NADPH) alimentent la synthèse d'acides nucléiques et de lipides, et d'autre part de fournir rapidement l'énergie nécessaire pour la prolifération. D'une manière intéressante ce comportement est similaire à « l'effet Warburg » observé dans des cellules cancéreuses ³¹⁰. Il a été observé que le métabolisme du glucose peut être modulé par la signalisation du TCR après reconnaissance de l'antigène, par des cytokines (IL-7 notamment) et par le récepteur de costimulation principal CD28 ³¹¹⁻³¹³. En l'absence de ces signaux le taux de glycolyse diminue et les molécules pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 s'activent et induisent la mort cellulaire ³¹⁴. Altérer le métabolisme du glucose des LT CD8 limite la capacité proliférative, la production d'IFN γ et induit l'activation de molécules pro-apoptotiques. Inversement, la surexpression du GLUT1 (transporteur du glucose) par les CD8 augmente la synthèse cytokinique et la prolifération après activation ³⁰⁹.

La division cellulaire est un paramètre important qui permet de réguler la formation des réponses effectrices et mémoires. Les divisions cellulaires successives permettent d'opérer des modifications de la chromatine afin de moduler l'expression de gènes associés à certaines propriétés des LT CD8. Par exemple, l'expression d'IFN γ par les LT CD8 est dépendante d'un nombre précis de divisions cellulaires. A terme, les LT CD8 acquièrent des fonctions effectrices et deviennent des LT CD8 effecteurs ³¹⁵. Leurs propriétés migratoires sont également modifiées pour permettre leur sortie des organes lymphoïdes secondaires en direction de la périphérie et du site d'infection.

3.5. Fonctions effectrices

Les fonctions effectrices des LT CD8 se présentent sous deux formes : la cytotoxicité (ou la capacité d'éliminer des cellules infectées/tumorales) et la production d'une variété de cytokines et de chemokines (Figure 17). La capacité de produire plusieurs molécules effectrices en simultanément est appelée polyfonctionnalité. La polyfonctionnalité est hautement prédictive du niveau de protection apportée par la réponse CD8. Elle est classiquement mesurée en évaluant la production des cytokines IL-2, TNF α , IFN γ , des chemokines CCL3, CCL4, CCL5 et du marqueur de dégranulation CD107a^{316,317}.

3.5.1. La cytotoxicité

Le mécanisme principal de la cytotoxicité fait intervenir la libération de granules lytiques par exocytose après reconnaissance de l'antigène spécifique à la surface d'une cellule cible. Les granules contiennent les formes actives de molécules lytiques appelées Perforine et Granzyme (Gzm) capables d'induire l'apoptose. La perforine est une glycoprotéine capable de se polymériser et former des pores dans la membrane de cellule cible. Les pores ont un diamètre de 5 à 20 nm et peuvent contenir jusqu'à 20 molécules de perforine³¹⁸. La perforine peut induire l'apoptose par elle-même *in vitro* si elle est présente en grande concentration. La formation de pores facilite le flux d'ions et de polypeptides au travers de la membrane et altère l'homéostasie de la cellule cible. Cela active indirectement les mécanismes pro-apoptotiques de la cellule cible et induit la mort cellulaire³¹⁹. Il est toutefois peu probable que ce mécanisme reflète son activité *in vivo*. En effet, l'activité lytique des LT CD8 dépend de la synergie entre la perforine et les molécules de Gzm. Il existe 5 molécules de Gzm chez l'Homme : GzmA, GzmB, GzmH, GzmK et GzmM³²⁰. La présence de pores à la surface de la cellule cible permet au GzmB d'accéder au cytoplasme et d'y activer la caspase-3 pour induire l'apoptose³²¹. Le mécanisme d'action des autres formes de Gzm est moins compris que celui de GzmB. Il est toutefois admis qu'ils induisent l'apoptose par des mécanismes ne faisant pas intervenir les caspases. Le GzmA par exemple (deuxième forme de Gzm la plus abondante après GzmB) agit directement sur les mitochondries en clivant une protéine impliquée dans le complexe I de la chaîne respiratoire. Cela permet une production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), une altération de la morphologie de la mitochondrie, et à terme l'induction de l'apoptose³²².

La libération des granules lytiques au niveau de la synapse est dépendante du calcium. Pourtant, les LT CD8 maintiennent une activité cytotoxique après déplétion de calcium^{323,324}. De plus, certaines sous-populations de LT CD4 présentent une activité cytotoxique en l'absence de molécules de Gzm, perforines et de granules lytiques en général³²⁵. Ces observations suggèrent l'existence d'un deuxième mécanisme, indépendant de la perforine, par lequel les LT CD8 peuvent induire l'apoptose d'une cellule cible³²⁶. Ce mécanisme alternatif fait intervenir la voie FasR-FasL. Les LT CD8 expriment à leur surface FasL qui leur permet d'induire l'apoptose dans la cellule cible en interagissant avec le récepteur Fas (FasR) à la surface de ces dernières. L'interaction FasL/FasR permet le recrutement et l'activation de pro-caspase-8 via la protéine adaptatrice FADD. Le complexe formé est appelé DISC pour *Death-Inducing Signalling Complex*. La forme activée de caspase-8 peut induire l'apoptose par deux mécanismes. Elle peut directement cliver les caspases-3, 6 et 7 pour initier l'entrée en apoptose de la cellule cible. Elle peut également induire une perméabilisation de la membrane mitochondriale au travers de la protéine BID. Cela provoque une libération de cytochrome c dans le cytoplasme qui permet l'assemblage d'un complexe appelé apoptosome. Ce complexe induit l'activation de la caspase-9, puis des caspases-3 et 7³²⁷.

Ainsi il existe deux mécanismes principaux pour l'activité cytotoxique des LT CD8. L'un très rapide, faisant intervenir la perforine, et un second plus lent et indépendant de la perforine faisant intervenir la voie FasR/FasL. En effet, l'initiation de l'apoptose par la voie FasL/FasR intervient avec un décalage de 2 heures par rapport à la voie faisant intervenir la perforine. D'une manière intéressante les deux mécanismes utilisent la caspase-3 comme substrat commun pour initier l'apoptose de la cellule cible (dans le cas où la perforine est associée au GzmB). Les deux mécanismes ne sont pas mutuellement exclusifs et sont déployés en simultané pour assurer une activité cytotoxique optimale³²⁸.

3.5.2. *Production de cytokines et chemokines*

IL-2 est le facteur de croissance principal des cellules T. Bien qu'il soit principalement produit par les LT CD4, les LT CD8 sont également capables d'en produire. La production d'IL-2 permet l'expansion des LT CD8, l'acquisition de fonctions effectrices et

l'établissement d'une réponse mémoire ³²⁹. Dans le cadre de l'infection à VIH la production d'IL-2 est maintenue dans les cas de non progression vers le stade SIDA. Toutefois, IL-2 induit l'activation et la prolifération des LT CD4 augmentant ainsi le nombre de cibles potentielles pour le virus.

Tumor necrosis factor- α (TNF α) est un facteur antiviral important produit par les LT CD8. TNF α est initialement exprimé à la surface des LT CD8 avant de subir un clivage enzymatique permettant de le libérer sous sa forme soluble. La forme soluble de TNF α se fixe spécifiquement sur le récepteur TNF-RI permettant d'initier une cascade de signalisation aboutissant à l'apoptose de la cellule cible. A l'inverse la forme membranaire de TNF α se fixe sur le récepteur TNF-II et permet l'activation de la voie NF κ B. Enfin, TNF α peut augmenter l'expression du CMH-I et des cytokines IL-12 et IL-18, toutes deux nécessaires pour la production d'IFN γ par les LT CD8.

IFN γ est le seul membre des interférons de type II, une famille de cytokines découvertes grâce à leur capacité à interférer avec le cycle de réplication d'Influenza. IFN γ exerce son activité antivirale en favorisant l'expression et la stabilité des molécules du CMH-I et en induisant l'expression de gènes associés à des sous-unités de l'immunoprotéasome et aux protéines de transports TAP. Il a également été montré que IFN γ peut augmenter la susceptibilité à l'apoptose de cellule infectée, en augmentant l'expression des récepteurs TNF-RI et Fas. Dans le contexte de l'infection à VIH IFN γ a deux facettes. D'une part IFN γ joue un rôle important dans la réponse antivirale en permettant d'inhiber la réplication virale. D'autre part, il a été montré que dans certaines conditions IFN γ peut augmenter la réplication virale.

Les chemokines majoritairement produites par les LT CD8 sont appelées **β -chemokines**. Ces dernières incluent CCL3 (ou MIP-1 α pour *macrophage inflammatory protein-1 α*), CCL4 (ou MIP-1 β) et CCL5 (ou RANTES pour *regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted*). Les chemokines CCL3 et CCL4 peuvent être retrouvées dans les granules lytiques tandis que CCL5 est situé dans des vésicules appelées RSV (*RANTES secretory vesicles*) qui seront également libérées après activation. La synthèse de CCL3 et CCL4 intervient quelques heures après l'activation tandis que la synthèse de CCL5 est observée avec un délai de quelques jours. Toutes permettent un recrutement de cellules lymphoïdes et myéloïdes sur le site d'infection. Certaines observations faites *in vitro* suggèrent un effet inhibiteur de la réplication virale dans le contexte de l'infection à VIH. Ces

chemokines sont capables de se fixer sur CCR5, le co-récepteur utilisé par le virus pour l'attachement et l'entrée dans la cellule cible, bloquant ainsi les premières étapes du cycle de réplication. Toutefois le rôle de ces chemokines *in vivo* est débattu. Il semblerait que ces chemokines n'empêchent pas l'infection de monocytes, mais au contraire augmentent la réplication virale³³⁰. Il a également été suggéré que les concentrations physiologiques de β -chemokines ne sont pas suffisantes pour exercer une activité antivirale³³¹. De plus, il a été montré que CCL5 peut faciliter l'attachement du VIH sur les cellules cibles et augmenter l'infektivité en activant des signaux de transduction dans la cellule cible³³². Ainsi, du fait de leur rôle chimioattractant, il est possible que les β -chemokines contribuent à la pathogénèse de l'infection en recrutant de nouvelles cibles pour l'infection et la réplication virale.

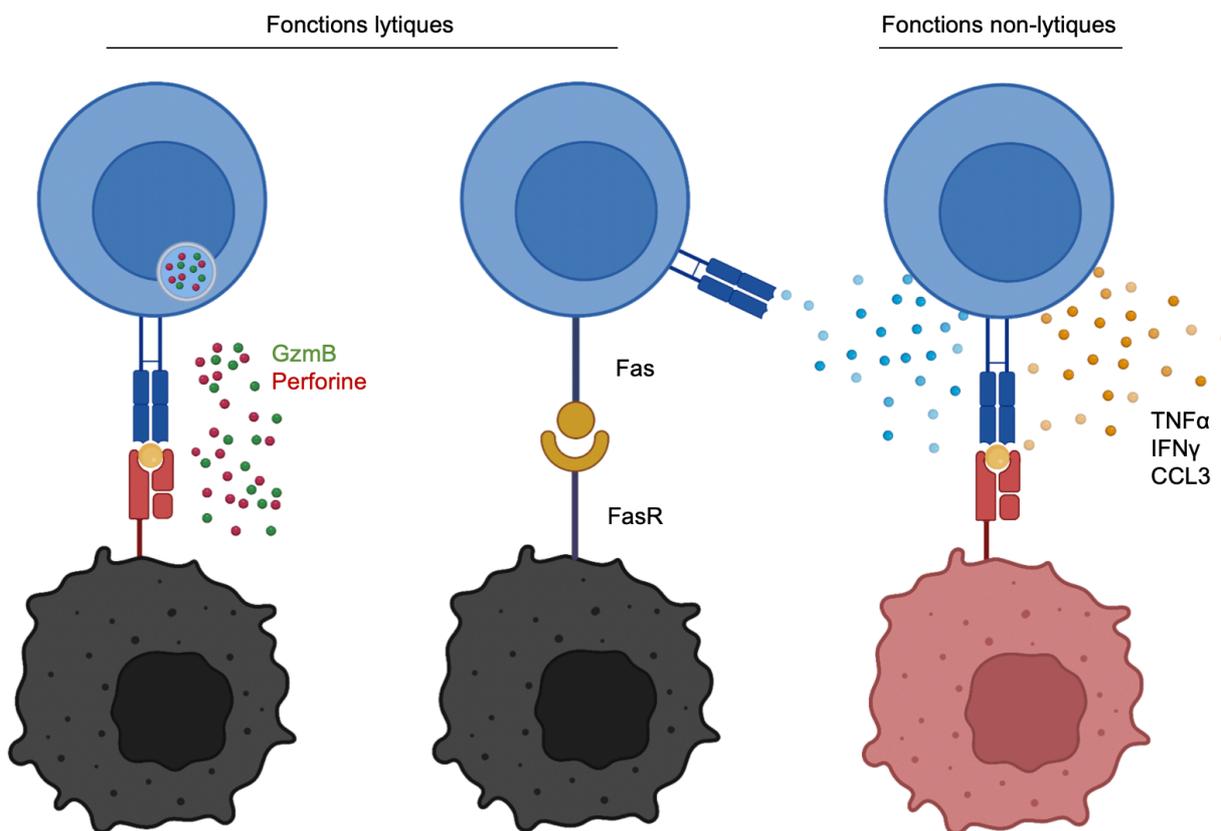


Figure 17 - Fonctions effectrices des LT CD8. A gauche : Mécanisme cytotoxique sous la dépendance de GzmB et de perforine. Milieu : Mécanisme cytotoxique faisant intervenir la voie FasR-FasL. Droite : Mécanisme non-lytique faisant intervenir la production de cytokines/chemokines

3.6. Différenciation des LT CD8

La différenciation est le processus par lequel une cellule CD8 naïve acquiert les caractéristiques de cellules matures, notamment la capacité d'assumer des fonctions effectrices, de migrer vers les sites d'infection et d'établir une réponse mémoire. Après éradication du pathogène la majorité des LT CD8 effecteurs meurt par apoptose dans un processus appelé contraction ³³³. Les cellules qui survivent forment la réponse mémoire, capable de persister pendant des années. En cas de seconde rencontre avec l'antigène les cellules mémoires ont la capacité de répondre plus vite que ne le ferait une cellule naïve. Il a par exemple été montré que les LT CD8 mémoires produisent la chemokine CCL5/RANTES seulement quelques minutes après leur rencontre avec l'antigène, contre plusieurs jours pour une cellule CD8 naïve ³³⁴. Enfin, les LT CD8 mémoires persistent à une fréquence élevée. Pour toutes ces raisons les LT CD8 mémoires sont à la base du principe de vaccination ³¹⁵. Les pages suivantes décrivent l'hétérogénéité des LT CD8 effecteurs et mémoires ainsi que les modèles de différenciation proposés pour l'expliquer.

3.6.1. Les sous-populations effectrices et mémoires

En réalité le compartiment LT CD8 est beaucoup plus complexe que ne le laisse présager une simple distinction effecteur/mémoire. La réponse LT CD8 effectrice qui apparaît après rencontre avec l'antigène peut être divisée en deux sous-populations sur la base de l'expression de IL7R (récepteur de l'IL-7) et de KLRG1. Ces populations sont appelées SLEC (*Short Lived Effector Cells*) et MPEC (*Memory Precursors Cells*). Les SLEC sont IL7R⁻ KLRG1⁺, présentent de fortes fonctions effectrices et sont vouées à mourir par apoptose lors de la contraction. A l'inverse les MPEC sont IL7R⁺ KLRG1⁻ et sont destinées à survivre pour former la réponse LT CD8 mémoire. La diversité des LT CD8 effecteurs ne se réduit pas aux SLEC et MPEC, mais constituent un continuum de cellules avec d'un côté des cellules avec une longévité importante présentant un fort potentiel pour l'établissement d'une réponse mémoire, de l'autre des cellules terminalement différenciées avec de fortes fonctions effectrices, et au milieu des cellules avec un profil intermédiaire (Figure 18) ³³⁵. D'une manière similaire les LT CD8 mémoires peuvent être divisés en plusieurs sous-populations sur la base de leur fonction effectrice, de leur durée de vie et de l'expression de marqueurs phénotypiques. Les travaux de Sallusto *et al* ont initialement proposé une séparation du

compartiment mémoire en cellule Centrale Mémoire (CM) et Effecteur Mémoire (EM) (Figure 18) ³³⁶. Les CM expriment les récepteurs de migration CCR7 et CD62L (L-selectin, encodé par le gène *Sell*) leur permettant de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires, produisent de l'IL-2 et ont une capacité proliférative et une longévité supérieure. Les EM n'expriment pas CCR7 et CD62L mais présentent de meilleures fonctions effectrices et résident principalement dans le sang périphérique et dans les tissus (notamment dans le poumon et le foie) ³³⁷. L'analyse de nouvelles molécules de surface à la surface des LT CD8 a permis l'identification d'un nombre croissant de sous-populations lymphocytaires CD8⁺. En théorie il est possible d'identifier autant de sous-populations qu'il existe de combinaisons de marqueurs. Malgré cette complexité apparente, la majorité des marqueurs utilisés pour décrire les LT CD8 évolue d'une manière coordonnée en fonction de l'état de différenciation. Les molécules de surface CCR7, CD45RA, CD28, CD27 et CD57 sont particulièrement pertinentes pour évaluer l'état de différenciation (Figure 19).

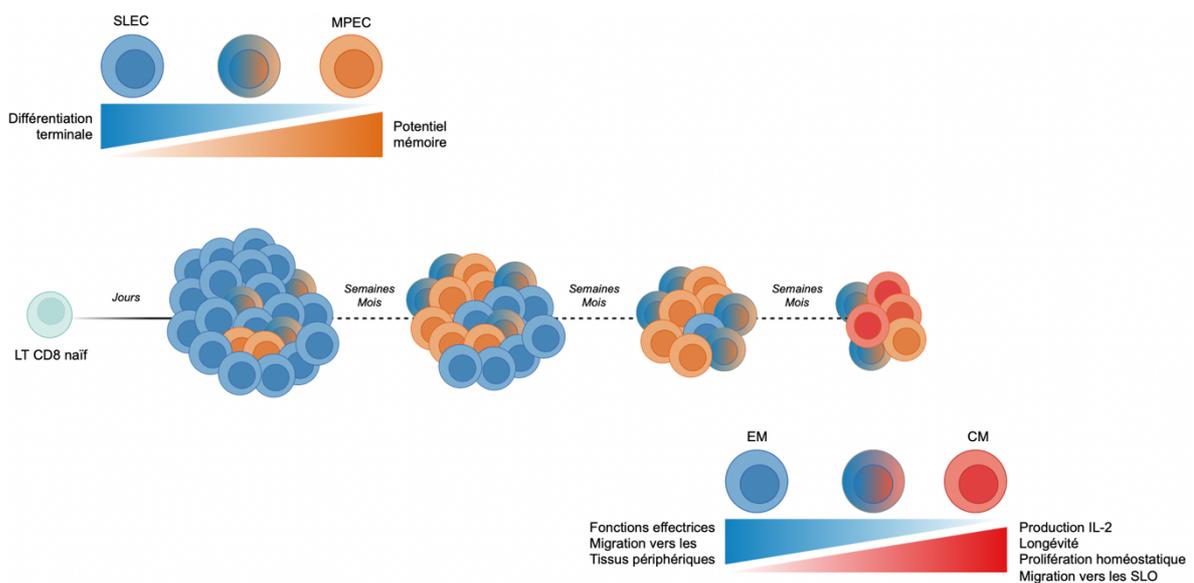


Figure 18 - Génération de cellules effectrices et différenciation progressive en cellules mémoires. Adapté de Cui et al. En réponse à une infection les LT CD8 naïfs s'activent, prolifèrent et se différencient en une population hétérogène de cellules effectrices (représentés par le gradient bleu vers orange). Les cellules hautement différenciées meurent par apoptose tandis que les MPEC forment la réponse LT CD8 mémoires. La population mémoire générée est également hétérogène.

3.6.2. Marqueurs phénotypiques des sous-populations CD8

CCR7 est un récepteur de chemokines présent à la surface des LT CD8 naïfs et des CM. Les ligands de CCR7 sont les chemokines CCL19 et CCL21 produites par les cellules stromales des organes lymphoïdes secondaires. CCR7 permet aux cellules CD8 naïves et CM de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires pour y rencontrer l'antigène spécifique et assurer l'immunosurveillance ²⁷². **CD28** est le récepteur costimulateur principal essentiel pour la transduction du signal d'activation provenant du TCR. L'interaction de CD28 avec ses ligands permet de diminuer le seuil d'activation de la cellule T, d'induire l'expression d'IL-2 et d'envoyer des signaux de survie (notamment en induisant une expression accrue de la molécule pro-apoptotique Bcl-xL). Il est exprimé à la surface de 50 % des LT CD8 (principalement sur les cellules naïves et les cellules peu différenciées) et la proportion de CD8 CD28⁺ décline avec l'âge ³³⁸. A l'instar de CD28, **CD27** est un corécepteur de stimulation intervenant dans la propagation et l'amplification du signal d'activation. CD27 est un membre de la super famille des TNFR. L'interaction avec son ligand CD70 active la voie NFkB, permet la survie et l'amplification du signal TCR. Les LT CD8 perdent l'expression de CD27 après stimulation répétée avec son ligand CD70. L'absence d'expression de CD27 définit donc les LT CD8 particulièrement avancés dans le processus de différenciation ³³⁹. **CD45RA** est une protéine transmembranaire impliquée dans l'activation des LT CD8. L'expression de CD45RA est perdue par les cellules naïves après activation (remplacée par CD45RO, un autre isoforme de CD45) et est réexprimée dans les cellules terminalement différenciées (appelées TEMRA, effecteur mémoire qui réexprime CD45RA) ³⁴⁰. **CD57** est une molécule d'adhésion exprimée à la surface des LT CD8 ayant subi des épisodes de prolifération intense. Son expression est augmentée avec l'âge et dans le contexte d'infections virales, de cancers ou encore de maladies auto-immunes. Les CD8 CD57⁺ ont une grande quantité de granules cytolytiques et des télomères très courts. L'expression de CD57 est couramment vue comme un marqueur « d'histoire proliférative » et sa présence est associée à la senescence répllicative ³⁴¹.

Sur la base de l'expression de chacun de ces marqueurs il est possible de distinguer du moins différenciés au plus différenciés : les LT CD8 naïfs (CCR7⁺ CD45RA⁺ CD28⁺ CD27⁺ CD57⁻), les centrales mémoires (CM ; CCR7⁺ CD45RA⁻ CD28⁺ CD27⁺ CD57⁻), les transitionnels mémoire (TM ; CCR7⁻ CD45RA⁻ CD28⁺ CD27⁺ CD57⁻), les effecteurs

mémoires (EM ; CCR7⁻ CD45RA⁻ CD28⁻ CD27⁺ CD57⁻) et les effecteurs mémoire ré-exprimant CD45RA (TEMRA ; CCR7⁻ CD45RA⁺ CD28⁻ CD27⁻ CD57⁺). Récemment une nouvelle sous-population de LT CD8 appelée T_{SCM} (*Stem Cell Memory*) a été décrite. Les T_{SCM} ont un phénotype très proche des LT CD8 naïfs (CCR7⁺ CD45RA⁺ CD28⁺ CD27⁺ CD57⁻) mais se distinguent par l'expression de gènes associés aux LT CD8 mémoires (Sca-1, Bcl-2, IL-2Rβ et CXCR3). Les T_{SCM} ont une durée de vie et un potentiel d'autorenouvellement important ainsi que la capacité de se différencier en CM, EM et en cellules effectrices³⁴².

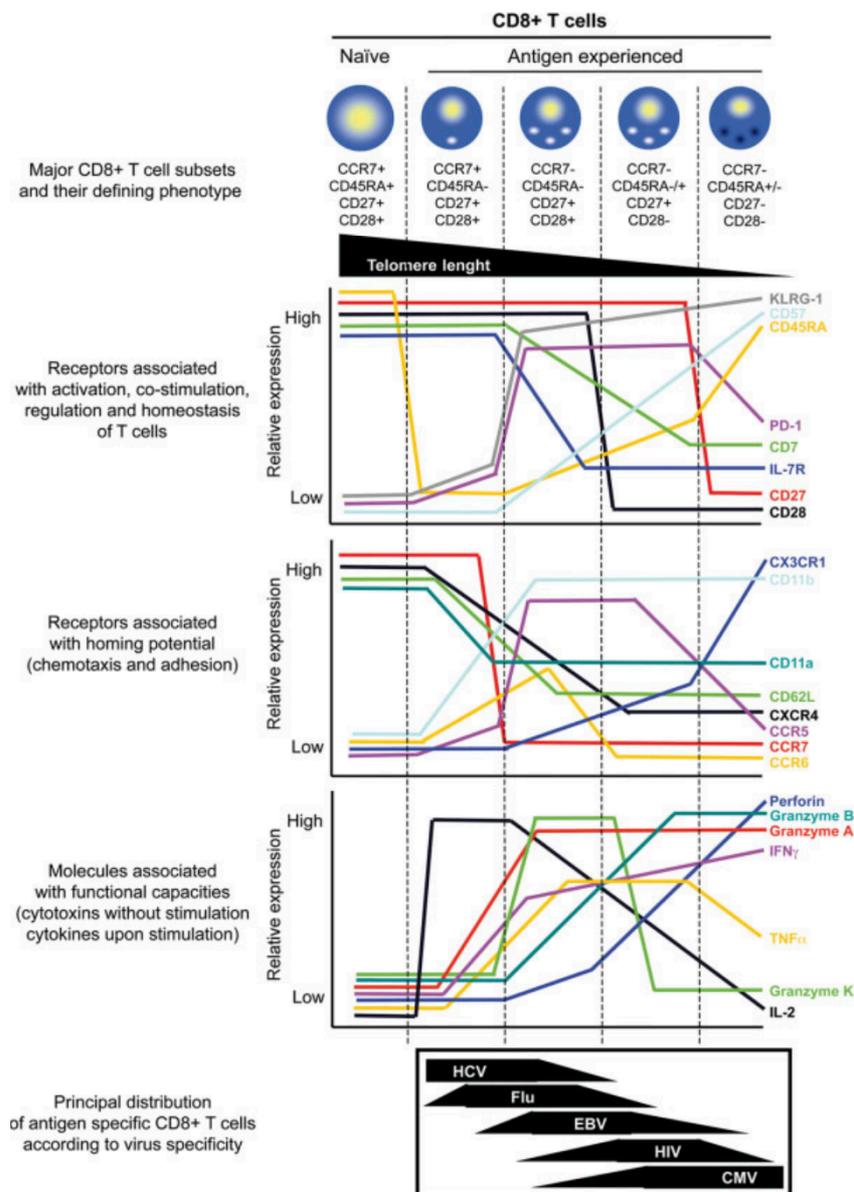


Figure 19 - Associations du phénotype de sous-populations de LT CD8 avec certains attributs fonctionnels. La taille des télomères et l'expression de récepteurs/molécules associées à la fonction des LT CD8 sont représentées en fonction de l'état de différenciation. La distribution phénotypique des LT CD8 dans plusieurs infections virales (HCV, Influenza, EBV, HIV, CMV) est également montrée. Adapté de Appay et al.

3.6.3. Les modèles de différenciation

Plusieurs modèles de différenciation ont été proposés pour expliquer l'hétérogénéité de la réponse CD8. D'après le modèle de différenciation circulaire (aussi appelé *On-Off-On*, Figure 20 A) les cellules CD8 naïves se différencient en LT CD8 effecteurs après rencontre avec l'antigène. Une fois le pathogène éliminé la plupart des LT CD8 effecteurs meurent par apoptose et un petit nombre d'entre eux survit pour se différencier en LT CD8 mémoires. Ces cellules mémoires émergent de la population effectrice de manière stochastique ou grâce à des propriétés intrinsèques. Ce modèle implique que toute cellule mémoire a été, à un moment donné, une cellule effectrice. Les LT CD8 mémoires nouvellement formés attendent une nouvelle rencontre avec l'antigène pour se redifférencier en cellules effectrices. La nature circulaire de ce modèle impliquerait des modifications transcriptionnelles et épigénétiques « On-Off-On » ainsi que des épisodes de différenciation (mémoire vers effecteur) et de dédifférenciation (effecteur vers mémoire) ³⁴³.

Le modèle de différenciation linéaire propose un point de vue alternatif (Figure 20 B). D'après ce modèle la force et la durée des signaux 1, 2 et 3 lors de l'activation initiale des LT CD8 sont des déterminants clés de la différenciation. Des signaux forts et répétés poussent les LT CD8 à la différenciation terminale tandis que des signaux plus faibles n'y parviennent pas générant ainsi les LT CD8 mémoires. Ainsi, même si les LT CD8 effecteurs sont les CD8 majoritaires au début de la réponse, ces cellules constituent l'étape terminale de différenciation. Lorsque ces cellules meurent par apoptose pendant la contraction, il ne reste que les cellules mémoires dont les faibles signaux reçus lors de l'activation n'ont pas permis la différenciation terminale. Les LT CD8 mémoires constitueraient ainsi un stade de différenciation intermédiaire et seraient générés directement à partir des LT CD8 naïfs. Le modèle de différenciation linéaire permet de concilier les observations faites montrant que les LT CD8 mémoires présentent des similitudes transcriptionnelles, phénotypiques et épigénétiques avec les cellules naïves et les LT CD8 effecteurs. Dans ce modèle les modifications génétiques et épigénétiques ne seraient pas cycliques mais linéaires avec des modifications graduelles au fur-et-à mesure que les LT CD8 s'approchent de la différenciation terminale ³⁴⁴.

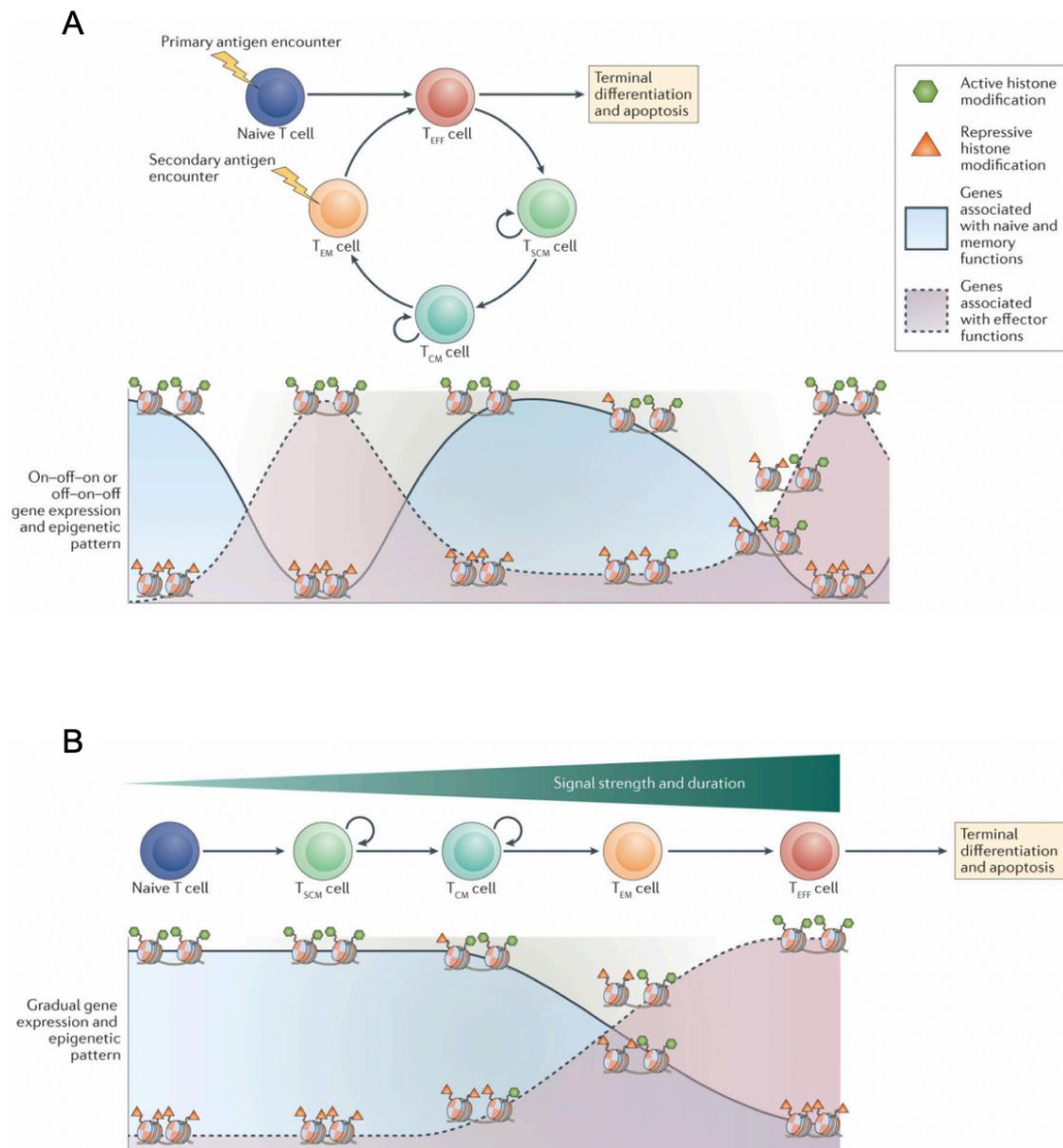


Figure 20 - Modèle de différenciation des LT CD8. Henning et al. (A) Dans le modèle de différenciation circulaire les cellules effectrices représentent un intermédiaire qui peut soit subir l'apoptose, soit se différencier en cellules mémoires après résolution de l'infection. Cela génère un motif cyclique de différenciation (Naïve, T_{EM}, T_{SCM}, T_{CM}, T_{EM} ..) nécessitant des modifications transcriptionnelles et épigénétiques cycliques. (B) Dans le modèle de différenciation linéaire, les cellules mémoires représentent un stade de différenciation intermédiaire résultant de cellules ayant reçu un faible signal d'activation. Dans ce modèle les cellules effectrices représentent le stade final de différenciation et sont vouées à mourir par apoptose. Les modifications transcriptionnelles et épigénétiques sont linéaires et graduelles dans ce modèle.

3.7. La réponse LT CD8 dans l'infection à VIH-1

L'une des preuves les plus directes du rôle des LT CD8 dans l'infection à VIH est l'association de certains HLA-I avec le contrôle naturel de l'infection ¹⁸⁴. Des macaques rhésus (RM) infectés par SIV montrent une virémie plus importante après déplétion des LT CD8 et le renouveau de cette population corrèle avec une diminution de la charge virale ^{345,346}. Ces observations sont faites dès la fin des années 1990 et suggèrent que les LT CD8 sont critiques pour contrôler la réplication de VIH/SIV.

La réponse LT CD8 spécifique du virus est initialement robuste, même chez les individus incapables de contrôler l'infection sans traitement. L'apparition d'une réponse ciblant le virus permet d'instaurer un contrôle plus ou moins efficace de la charge virale et provoque l'émergence de mutation, sur et autour de l'épitope, destiné à échapper à la réponse cellulaire. Ces mutations, dont la vocation est d'empêcher la présentation de l'antigène à la surface de la cellule infectée ou de limiter la reconnaissance par les LT CD8, apparaissent dès la primo-infection et perdurent tout au long de l'infection chronique. L'émergence de mutants est continuellement contrée par l'apparition de nouvelles réponses LT CD8 capables de reconnaître l'épitope mutée. Alors que les EC parviennent à contrôler l'infection, l'infection non traitée chez les progressseurs induit une dysfonction progressive des LT CD8 en biaisant le profil de différenciation et en limitant leur capacité à proliférer, produire des cytokines et afficher des fonctions effectrices ¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Cette altération de la réponse LT CD8 est appelée « épuisement ». L'épuisement (mieux connu sous le terme anglophone « exhaustion ») définit un état dysfonctionnel des LT CD8 ³⁴⁷. L'épuisement se manifeste par la perte progressive des fonctions effectrices, des modifications métaboliques, la présence d'un programme transcriptionnel distinct de celui observé chez les LT CD8 mémoires/effecteurs et l'expression durable de plusieurs récepteurs de coinhibition. L'épuisement des LT CD8 est un défi majeur car associé à un contrôle sous-optimal de l'infection.

3.7.1. Cytotoxicité

Les EC ont une fréquence importante de LT CD8 spécifiques du VIH. Toutefois la quantité de LT CD8 n'est pas synonyme de protection puisque les individus progressseurs avec une charge virale indétectable montrent des proportions similaires de LT CD8 spécifiques du

virus. La différence est avant tout qualitative. Les LT CD8 des EC sont caractérisés par une capacité supérieure à inhiber la réplication virale dans un modèle de coculture avec des LT CD4 autologues infectées³⁴⁸. Cette capacité dépend de l'activité cytotoxique des LT CD8 qui expriment des quantités élevées de perforine, GzmB et granulysine chez les EC. L'importance de la cytotoxicité est soulignée par le fait que l'expression de perforine corrèle inversement avec la charge virale¹⁴⁵. Le même groupe a démontré que l'expression accrue de perforine et GzmB est sous la dépendance de T-bet, un facteur de transcription fortement exprimé par les LT CD8 d'EC, impliqué dans la différenciation des CD8 et l'acquisition de fonctions effectrices³⁴⁹. A l'inverse l'expression accrue du facteur de transcription Eomes chez les progresseurs a été associée à l'épuisement, à l'expression de récepteurs d'inhibition et à une faible polyfonctionnalité³⁵⁰. Les LT CD8 spécifiques du VIH d'individus progresseurs sont notablement moins efficaces pour lyser des cellules infectées que des LT CD8 spécifiques du CMV *in vitro*, malgré une quantité similaire de cellules spécifiques de l'antigène³⁵¹. Certains groupes ont d'ailleurs démontré une expression réduite de perforine chez ces cellules. Des observations similaires ont été faites dans un modèle simien de RM où la transition vers la phase chronique est associée à une diminution de marqueurs cytolytiques³⁵².

3.7.2. Polyfonctionnalité

Les EC montrent des réponses LT CD8 avec une polyfonctionnalité supérieure. Betts *et al* ont démontré que les LT CD8 d'individus EC produisent des quantités importantes d'IFN γ , CCL3, TNF α , et IL-2 après stimulation. La polyfonctionnalité observée était supérieure à celle affichée par les progresseurs indépendamment du HLA et des sous-populations de cellules mémoires étudiées¹⁴⁶. A ce jour la plupart des études portant sur les LT CD8 spécifiques du VIH ont été réalisées à partir d'échantillons du sang périphérique. Pourtant la réplication virale intervient majoritairement dans les tissus lymphoïdes. De plus, il est connu depuis plusieurs années que les LT CD8 circulants sont plus cytotoxiques que leurs homologues dans les tissus lymphoïdes. Ces observations suggèrent l'existence de mécanismes distincts au sein des organes lymphoïdes permettant de contrôler la réplication virale. En 2019 une élégante étude de Buggert *et al* a décortiqué la réponse LT CD8 spécifique du virus dans les tissus lymphoïdes d'individus EC et progresseurs. Buggert *et al* montrent que les EC ont une fréquence plus importante de LT CD8 spécifiques du virus au sein des tissus lymphoïdes et que ces cellules sont capables de contrôler efficacement la

réplication virale. D'une manière intéressante, ce contrôle est médié par des mécanismes autres que la cytotoxicité. Les auteurs démontrent que les LT CD8 des EC expriment moins de marqueurs de cytotoxicité, moins de récepteurs d'inhibition et sont plus polyfonctionnels. Dans la même ligne que ces travaux, une équipe a démontré que la réponse LT CD8 dans la muqueuse rectale de 17 individus EC était bien plus polyfonctionnelle que celle observée chez les VC, non contrôleurs (> 10 000 copies/mL) et les individus traités par ART. Les LT CD8 de EC étaient capables de produire jusqu'à 4 cytokines en simultané parmi IFN γ , IL-2, TNF α , CCL3 et CD107a ²⁴⁶. Ainsi la polyfonctionnalité des LT CD8 reste un critère important pour le contrôle de l'infection, que ce soit dans le sang périphérique ou dans les tissus lymphoïdes. A l'inverse les LT CD8 spécifiques du virus des individus progressseurs sont majoritairement monofonctionnels et perdent la capacité de produire des molécules effectrices solubles (IL-2, TNF α , IFN γ , CCL3, etc.). L'importance de cette capacité est soulignée par le fait que la polyfonctionnalité, et pas la fréquence, des LT CD8 spécifiques du virus corrèle inversement avec la charge virale ¹⁴⁶.

3.7.3. Prolifération, survie et stemness

Les LT CD8 des EC montrent une résistance à l'apoptose et à la mort cellulaire. Yan *et al* ont mis en avant chez ces cellules une expression accrue de Bcl-2 (une molécule anti-apoptotique) et diminuée de caspase-3 (impliqué dans la voie de signalisation de l'apoptose) par les LT CD8 spécifiques du VIH et du CMV, par rapport à des patients progressseurs traités ³⁵³. Cette capacité de survie des LT CD8 d'EC est potentiellement associée à des différences dans le métabolisme de ces cellules. En effet, alors que la réponse LT CD8 des progressseurs est marquée par une dépendance importante vis-à-vis du glucose, les EC montrent une plasticité métabolique supérieure en maintenant la capacité d'utiliser à la fois la glycolyse et le métabolisme mitochondrial. Ces différences ont été associées à des utilisations préférentielles des voies mTORC2 pour les EC et mTORC1 pour les progressseurs. Ces deux voies sont impliquées à différents niveaux dans la différenciation des LT CD8 : mTORC2 est associé à la régulation des fonctions des cellules mémoires tandis que mTORC1 régule le métabolisme glycolytique et la formation de réponses effectrices. Ces données suggèrent que les LT CD8 des EC ont une meilleure capacité d'adaptation et sont potentiellement mieux équipés pour survivre dans des conditions de stress métabolique ³⁵⁴.

Les LT CD8 des EC ont également une capacité de prolifération importante, soutenue par des télomères longs et une activité de la télomérase supérieure^{355,356}. Plus récemment le rôle du facteur de transcription *Tcf7* a été mis en avant pour expliquer le phénotype des EC. Le gène de *Tcf7* code pour la protéine TCF-1 et corrèle directement avec les capacités prolifératives et diminue progressivement au fur et à mesure des stimulations antigéniques. TCF-1 est hautement exprimé par les LT CD8 spécifiques du virus chez les EC et permet de réguler l'expansion de ces cellules³⁵⁷. L'expression de ce gène est associée à une autre capacité importante des cellules T : la « *stemness* ». La *stemness* définit la capacité d'une cellule T à s'auto-renouveler en maintenant un profil de différenciation précoce et une forme de multipotence. Les cellules avec un potentiel de *stemness* important préservent la capacité de se différencier et proliférer après stimulation. Cette capacité est caractéristique des sous-populations T_{SCM} et T_{CM} et constitue un corrélat important du contrôle de l'infection.

Cette capacité est absente chez les individus progressifs où l'activation immunitaire chronique est associée à l'accumulation de LT CD8 hautement différenciés CD28⁻ CD57⁺. Ces cellules sont caractérisées par une faible production d'IL-2, une capacité réduite de prolifération et des télomères très courts^{51,358}. De plus, les cellules spécifiques du virus ont une expression réduite des facteurs anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL et montrent une susceptibilité accrue à l'apoptose induite par la voie Fas³⁵⁹. Conjointement la capacité de survie et de prolifération suggère un potentiel de *stemness* supérieur des LT CD8 chez les EC, même lorsque les conditions *in vivo* sont relativement similaires du point de vue de la charge virale.

3.7.4. Le rôle du TCR

Puisque la reconnaissance des antigènes viraux intervient par le TCR, il est probable que les caractéristiques de ce dernier (affinité, avidité, avidité fonctionnelle) soient importantes pour le contrôle de l'infection. L'avidité fonctionnelle du TCR est influencée par plusieurs paramètres incluant la nature du TCR, la molécule CD8, la présence/absence de récepteurs costimulateurs et coinhibiteurs, la nature et le niveau d'expression de l'épitope, et la nature/densité de la molécule de CMH-I. Dans le cas des individus progressifs, l'expression soutenue de plusieurs récepteurs d'inhibition est associée à une avidité fonctionnelle réduite³⁶⁰. En se concentrant uniquement sur l'avidité du TCR,

indépendamment de l'environnement dans lequel il se trouve, on observe que les LT CD8 des EC montrent des TCR avec une avidité importante, leur permettant de reconnaître rapidement un antigène présenté par le CMH-I. C'est notamment le cas de la réponse B27-KK10 où l'avidité du TCR est associée à une forte polyfonctionnalité permettant un contrôle efficace de l'infection ^{316,361}. L'existence de TCR publics a été démontré dans cette même réponse. Ces TCR publics, partagés par plusieurs EC, montrent une avidité importante et permettent une suppression efficace de la réplication virale ³⁶². Par ailleurs, Košmrlj *et al* suggèrent que le HLA-B*57, associé au contrôle, est capable de « mouler » le répertoire TCR pendant la sélection thymique de manière à générer des TCR capables de reconnaître l'antigène présenté avec moins de points d'ancrage ³⁶³. Cela permet de créer un répertoire TCR capable de réactivité croisée, et donc, moins sensible aux mutations d'échappement du virus ³⁶⁴. La réactivité croisée supérieure des LT CD8 d'EC a été observée *in vitro* et *ex vivo* ³⁶⁵. A l'inverse, les TCR des LT CD8 spécifiques du virus chez les progresseurs sont caractérisés par une faible réactivité croisée ³⁶⁶. D'une manière intéressante, la spécificité des LT CD8 est associée au contrôle ou à la progression. Les LT CD8 des EC ont tendance à cibler les épitopes de la protéine structurelle Gag ^{185,367,368}. La magnitude de la réponse LT CD8 spécifique de Gag est associée à des charges virales plus faibles et une préservation du compartiment LT CD4 ³⁶⁹. L'infection à VIH-2, associée à une progression plus lente vers la maladie et une réponse LT CD8 robuste, montre également une prédominance de LT CD8 ciblant Gag ³⁷⁰⁻³⁷⁴. A l'inverse, les réponses ciblant Env ou les protéines virales accessoires sont associées à des charges virales plus élevées ³⁷¹.

3.8. Impact du traitement sur les altérations des LT CD8

3.8.1. Les LT CD8 globaux

La réplication intense du virus, associée à la translocation de produits microbiens du GALT vers le sang périphérique aboutit à une augmentation de la fréquence de LT CD4 et CD8 exprimant des marqueurs d'activation comme HLA-DR ou CD38 ^{375,376}. D'une manière importante l'activation pendant l'infection non traitée corrèle mieux avec la progression de la maladie que la charge virale ⁴⁶. L'initiation du traitement permet de réduire l'expression des marqueurs d'activation aussi bien pour les progresseurs que pour les EC ^{377,378}. En revanche ART ne permet pas de diminuer l'activation au même niveau que des individus

séronégatifs³⁷⁹⁻³⁸¹. L'activation résiduelle peut également être expliquée par une fibrose des tissus lymphoïdes, une déplétion majeure des Tregs ou une perte d'intégrité de la barrière intestinale^{382,383}. Il n'est pas clair aujourd'hui si l'initiation précoce du traitement peut normaliser l'activation immunitaire en limitant ces phénomènes. Ces considérations sont cruciales car une activation résiduelle peut avoir des conséquences sur la pathogenèse de la maladie. Les LT CD4 activés sont notamment plus sensibles à l'infection, et l'apoptose induite par activation est le mécanisme majeur impliqué dans la déplétion des LT CD4 pendant la primo-infection et après interruption du traitement³⁸⁴.

Bien que l'on observe une augmentation de la taille des télomères après traitement, ceux-ci restent plus petits que ceux d'individus séronégatifs³⁸⁵. Un processus similaire a été observé pour les LT CD4, mais d'une ampleur moindre par comparaison avec les LT CD8.

Le compartiment LT CD8 naïfs est également altéré pendant l'infection. Les cellules naïves sont déplétées pendant la primo-infection d'une manière plus marquée pour les progresseurs que pour les VC et EC³⁸⁶. L'initiation du traitement normalise partiellement cette déplétion mais la fréquence de cellules naïves correspond à celles observées chez des individus séronégatifs plus âgés. La diminution du nombre de cellules naïves peut être expliquée par une production thymique réduite chez les individus VIH+. D'une manière générale la fréquence du compartiment naïf est un bon marqueur de l'âge immunologique chez l'Homme et son déclin est associé à la progression de la maladie^{51,278}.

Le ratio CD4/CD8 est inversé pendant l'infection non traitée, principalement à cause de la destruction des LT CD4 et d'une expansion du compartiment LT CD8³⁸⁷. L'introduction de ART permet de restaurer partiellement ce ratio mais le compte CD8 reste stable entre la primo-infection et la phase chronique. L'une des causes probables de l'expansion des LT CD8 est la séropositivité à CMV, qui est plus élevée chez les individus infectés par VIH que dans la population globale³⁸⁸. Le CMV induit des réponses LT CD8 de magnitude importante qui peuvent parfois composer 50 % des cellules spécifiques d'antigènes chez les personnes âgées³⁸⁹. L'infection à CMV peut avoir des conséquences majeures pour les individus infectés par VIH. La séropositivité CMV est associée à un risque accru de comorbidités non-liées au SIDA et le virus peut indirectement impacter la réponse LT CD8 via la production de cytokines inflammatoires ou en limitant la diversité du TCR par inflation de la réponse mémoire spécifique du CMV^{388,389}.

3.8.2. Les LT CD8 spécifiques du VIH

Il est possible d'observer un déclin rapide de la fréquence des LT CD8 spécifiques du virus une à deux semaines après initiation du traitement. Une fois la virémie complètement contrôlée, les réponses spécifiques du virus dans le sang périphérique continuent de diminuer avec une demi-vie d'environ 38,8 semaines pendant au moins deux ans³⁹⁰⁻³⁹². Malgré cette diminution les réponses restent détectables chez la plupart des individus même après des années de traitement^{393,394}. En plus de permettre la contraction des réponses spécifiques du virus, le traitement permet de restaurer partiellement certaines altérations immunitaires associées avec l'infection. Plusieurs études ont montré que l'initiation du traitement permet de réduire l'expression des récepteurs d'inhibition et de restaurer une forme de polyfonctionnalité³⁹⁵⁻³⁹⁷. L'expression de PD-1 par les LT CD8 spécifiques du virus, qui corrèle avec la réplication virale, est réversible après introduction du traitement^{398,399}. Les récepteurs d'inhibition CD160 et TIM-3 montrent une évolution similaire^{400,401}. Par ailleurs, le traitement est également capable de réduire la fréquence de LT CD8 pro-apoptotiques³⁵³. Au vu de ces observations il serait tentant de spéculer qu'en rendant les LT CD8 moins apoptotiques et moins sensibles à l'inhibition, le traitement permet de restaurer la fonctionnalité des LT CD8.

Pourtant même si l'expression des récepteurs d'inhibition est réduite, le niveau d'expression reste plus élevé que chez des individus séronégatifs³⁵⁰. Migueles *et al* ont également montré que les capacités à proliférer et à afficher des fonctions cytotoxiques ne sont pas restaurées par l'initiation du traitement^{402,403}. Par ailleurs, certaines modifications épigénétiques persistent même après des années de traitement. Youngblood *et al* ont montré que le promoteur de PD-1 reste déméthylé chez des individus sous cART depuis plus de deux ans⁴⁰⁴. Dans certains cas l'interruption du traitement après plusieurs années sous cART induit les mêmes altérations immunitaires déjà décrites, parfois sous une forme plus sévère^{405,406}. Conjointement ces données suggèrent que les LT CD8 spécifiques du virus restent sous-optimaux et qu'il existe des anomalies qualitatives qui persistent malgré le contrôle de la charge virale.

Depuis quelques années le schéma de prise en charge clinique des individus infectés par VIH a été modifié : on cherche maintenant à initier le traitement le plus tôt possible.

L'initiation précoce du traitement permet de limiter l'établissement du réservoir, la déplétion des LT CD4 mais également les altérations qualitatives de la réponse LT CD8. Pendant l'infection naturelle, la virémie semble être le principal responsable de la dysfonction des LT CD8. Les individus présentant une charge virale plus faible montrent des LT CD8 avec de meilleures fonctions^{348,407}. Les VC et les EC qui contrôlent mieux la virémie, présentent de manière quasi-systématique des LT CD8 plus polyfonctionnels et avec de meilleures fonctions lytiques. De plus, les individus ayant initié le traitement tôt dans l'infection présentent des LT CD8 avec de meilleures fonctions que ceux l'ayant initié dans la phase chronique^{146,408}. Il est probable que le contrôle précoce de la virémie permet de limiter la destruction des LT CD4 et préserver l'architecture des organes lymphoïdes secondaires, contribuant ainsi à éviter l'épuisement des réponses LT CD8. Une étude de Oxenius *et al* a suivi l'évolution de la réponse LT CD8 pendant 3 ans chez des individus ayant commencé le traitement au moment de la séroconversion. L'initiation précoce du traitement chez ces individus est associée à une persistance des réponses LT CD8 spécifiques du virus et un maintien de leur fonctionnalité. L'effet bénéfique de cette approche est maintenue même chez des individus ayant arrêté transitoirement le traitement 2 et 4 semaines après l'initiation précoce de cART⁴⁰⁹. Très récemment, Takata *et al* ont évalué le double effet d'une initiation précoce et d'un traitement à long terme sur le compartiment LT CD8. Dans cette étude l'initiation précoce est associée à une persistance des LT CD8 spécifiques du VIH avec une capacité de prolifération et une activité cytotoxique importante *in vitro*, par comparaison avec des individus ayant initié le traitement pendant l'infection chronique. Le potentiel de prolifération chez ces individus corrèle directement avec l'expression de TCF-1 suggérant un potentiel de stemness préservé malgré les années de traitement. D'une manière importante l'expression de TCF-1 corrèle également avec un temps plus long entre l'interruption du traitement et le rebond de la charge virale (48 contre 13 jours pour les individus traités depuis la phase chronique)⁴¹⁰.

Cependant cette approche n'est pas toujours possible. Le traitement précoce n'est pas applicable dans toutes les régions du monde, notamment dans certains pays en développement durement touchés par l'infection à VIH-1. En 2021, on estime à 27,8 millions le nombre de personnes recevant cART soit une couverture thérapeutique de « seulement » 75 %. De plus, l'initiation précoce n'a pas toujours été la norme en clinique et n'est pas possible pour les cas d'infection antérieurs au développement des thérapies antirétrovirales. Pour ces individus le traitement à long terme vient avec une autre problématique : le déclin de

l'immunocompétence associée au vieillissement naturel pourrait affecter l'efficacité déjà limitée des réponses LT CD8 spécifiques du virus.

3.9. Impact vieillissement sur les LT CD8

Une fonction importante du système adaptatif est la maintenance d'une réponse mémoire à très long terme. Cette réponse mémoire est dynamique : elle ne dépend pas de la longévité de quelques cellules mémoires mais bien de la division successive de leurs progénitures pour maintenir une population capable d'assurer une protection en cas de seconde rencontre avec l'antigène ⁴¹¹. La dépendance de ce système sur la division cellulaire le rend hautement sensible aux altérations qui accompagnent le vieillissement naturel. En effet, le vieillissement est accompagné d'altérations majeures des différents composants de la réponse immune, appelé immunosénescence, auxquelles les LT CD8 sont particulièrement sensibles. Ces altérations ont pour conséquence une efficacité vaccinale réduite notamment dans le contexte d'influenza et une susceptibilité accrue à différentes maladies et infections ^{412,413}. L'épidémie récente à SARS-Cov-2 a par exemple montré une mortalité supérieure pour les personnes âgées ⁴¹⁴.

Au cours de la vie, le système immunitaire doit continuellement reconstituer le compartiment de lymphocytes T naïfs pour compenser la perte de ces cellules consommées par les stimulations antigéniques multiples. Il existe deux mécanismes principaux pour le maintien du compartiment des lymphocytes T naïfs: la thymopoïèse dans le thymus et la prolifération homéostatique des cellules naïves périphériques ⁴¹⁵. L'une des modifications les plus importantes du système immunitaire avec l'âge est la régression ou involution du thymus. L'involution du thymus correspond à une diminution de la masse tissulaire et cellulaire du thymus ainsi qu'une perte de l'organisation et de l'architecture tissulaire ⁴¹⁶. La résultante est une production thymique drastiquement réduite avec l'âge : chez le jeune adulte, 20 % des cellules T naïves proviennent du thymus contre moins de 1 % chez les individus âgés de plus de 50 ans ⁴¹¹. En conséquence, le nombre absolu et la fréquence de LT CD8 naïfs diminuent avec le temps et constituent ainsi des marqueurs clés du vieillissement immunitaire ^{417,418}. En amont de la thymopoïèse, le maintien d'une immunité efficace dépend de la capacité des précurseurs hématopoïétiques (HSC) de la moelle osseuse et des progéniteurs hématopoïétiques (HPC) sanguins à alimenter le pool de cellules

immunocompétentes matures ⁴¹⁹. Plusieurs études ont montré une altération qualitative des HSC d'individus âgés. Ces derniers montrent une accumulation de dommage à l'ADN et un profil biaisé de différenciation, en faveur de la lignée myéloïde au détriment de la lymphopoïèse ⁴²⁰⁻⁴²³. Notre équipe a également montré que les HPC d'individus âgés montrent des signes de sénescence et une susceptibilité accrue à la mort cellulaire par pyroptose. Ces cellules présentent une réduction de la taille des télomères et de l'activité de la télomérase qui subsistent au sein de leurs progénitures de la lignée lymphoïde ⁴²⁴. Conjointement, ces données suggèrent des altérations quantitatives et qualitatives des LT CD8 naïfs, mais également des cellules à la source même de leur production.

En plus des altérations du compartiment des lymphocytes T naïfs, l'âge est également accompagné d'une altération du compartiment LT CD8 mémoire. Les individus âgés montrent typiquement une accumulation de LT CD8 CD28⁻ CD57⁺. Ces cellules sont considérées comme approchant la sénescence et sont caractérisées par un potentiel de prolifération réduit, une production d'IL-2 diminuée, des télomères courts et un métabolisme énergétique altéré ⁵¹. En accord avec ces données, Martinez-Zamudio *et al* montrent une forte activité β -galactosidase lié à la sénescence (SA- β Gal) au sein de PBMC avec l'âge. Cette accumulation de cellules sénescents est particulièrement marquée au sein des LT CD8 : 64 % des LT CD8 d'individus dans leur soixantaine ont une activité SA- β Gal importante. Ce profil particulier est associé à une accumulation de dommages à l'ADN, une capacité proliférative réduite et une expression accrue du régulateur du cycle cellulaire p16 impliqué dans la sénescence ⁴²⁵. De plus, le vieillissement est associé avec la présence de cellules terminalement différenciées TEMRA dont l'accumulation dépend en grande partie de l'infection par CMV, dont l'incidence augmente avec l'âge ⁴¹⁸. Il existe également des altérations de la signalisation en aval du TCR. Plusieurs études indépendantes ont montré des modifications de la concentration de calcium intracellulaire, de la distribution des facteurs de transcription NFAT et AP-1 ou encore de l'activation des protéines Lck et Zap70 avec l'âge ⁴²⁶⁻⁴²⁹. Couplées avec l'accumulation de cellules n'exprimant plus le co-récepteur CD28, ces données suggèrent que les signaux 1 et 2 de l'activation cellulaire ne sont pas optimaux chez les LT CD8 d'individus âgés. Enfin, les LT CD8 d'individus âgés sont également caractérisés par des modifications épigénétiques. Le gène *Ii7r* subit des modifications épigénétiques conduisant à son extinction transcriptionnelle et à l'inactivation de la voie de signalisation de l'IL-7, importante pour la prolifération homéostatique et la survie des cellules T ⁴³⁰⁻⁴³².

Il est important de noter que l'infection à VIH-1 est responsable d'une forme « d'accélération » du vieillissement immunitaire. Beaucoup des altérations intervenant naturellement avec l'âge (présentées dans les paragraphes précédents) sont amplifiées au cours de l'infection à VIH-1. A âge équivalent, les individus infectés par VIH montrent des LT CD8 avec des télomères plus courts et une activité de la télomérase plus faible, une accumulation plus importante de LT CD8 CD28- CD57+, une fréquence et un nombre absolu de LT CD8 naïfs diminués et une production thymique réduite par comparaison avec des individus séronégatifs⁵¹. En conséquence, les individus infectés par VIH-1, comme les personnes âgées, montrent une réponse réduite à la vaccination influenza ^{433,434}. En d'autres termes, le système immunitaire des individus infectés par VIH-1 depuis des années subit une double peine : d'une part à cause du vieillissement naturel de ces individus, mais également à cause des effets délétères de l'infection.

RÉSUMÉ ET OBJECTIFS DE THÈSE

Le VIH est un problème de santé publique majeur pour lequel il n'y a pas de vaccin ou de traitement curatif. La guérison de l'infection à VIH nécessite l'éradication du réservoir, un ensemble de cellules infectées de manière latente et qui persistent indéfiniment. Alors que l'éradication totale du réservoir semble être un objectif ambitieux, une diminution significative de la taille du réservoir est un objectif plus modeste qui pourrait permettre la rémission des individus infectés par le virus, c'est-à-dire l'interruption du traitement sans rebond de la charge virale (aussi appelée guérison fonctionnelle).

Pour y parvenir les approches récentes sont centrées autour de la stratégie du « shock and kill » et de l'efficacité des LT CD8 spécifiques du VIH. La qualité et la fonctionnalité de ces cellules est donc un critère important pour la réussite de cette stratégie. Malheureusement les réponses LT CD8 dans la majorité des individus infectés par VIH restent sous-optimales. Pendant l'infection non traitée la réplication virale importante et l'activation immunitaire chronique aboutissent à l'épuisement progressif des LT CD8 et limitent leur capacité à contrôler l'infection. Par ailleurs les individus infectés par le virus montrent une accumulation de cellules ayant perdu l'expression de CD28 et exprimant CD57. Ces cellules sont caractérisées par des télomères plus courts et sont considérées comme approchant de la sénescence. Conjointement ces observations expliquent en partie l'incapacité des LT CD8 à contrôler efficacement la réplication virale.

Une littérature robuste plaide en faveur d'une initiation précoce du traitement pour limiter les altérations immunitaires et augmenter les chances de rémission des individus infectés par le virus. Cette approche n'est pas toujours possible et un grand nombre d'individus ayant commencé le traitement tardivement sont sous cART depuis plusieurs décennies. De plus, le vieillissement naturel de ces individus est associé à l'accumulation d'altérations immunitaires, appelée immunosénescence, risquant de compromettre davantage une réponse LT CD8 déjà peu efficace. Puisque les immunothérapies visant à induire la rémission se basent en grande partie sur les réponses LT CD8, il est primordial d'évaluer chez ces individus le potentiel restant des LT CD8 spécifiques du VIH après des années de traitement.

Pour y parvenir nous avons étudié la réponse LT CD8 spécifique du VIH au sein de la cohorte IMMUNOCO. Initialement fondée en 1991, l'objectif initial de la cohorte IMMUNOCO était d'étudier la réponse LT CD8 spécifique du virus avec la progression vers

la maladie. La cohorte était composée de 152 individus recrutés entre 1991 et 1997. Sur les 152 individus composant la cohorte initiale, 30 sont décédés, 94 sont perdus de vue et 28 restent suivis sur le site de la Pitié-Salpêtrière en 2017. En ajoutant des échantillons datant de 1988 à aujourd'hui, cette cohorte nous offre la possibilité unique d'étudier l'évolution naturelle et sous traitement de l'infection à VIH pendant plus de 27 ans. Pour évaluer le potentiel de la réponse LT CD8 après des années de traitement, plusieurs objectifs ont été établis :

Objectif 1 – Évaluation de l'état d'activation, de différenciation et de senescence

Le phénotype des LT CD8 globaux et spécifiques du VIH a été caractérisé par cytométrie en flux pour évaluer l'état de différenciation, d'activation et de senescence au travers de l'expression des marqueurs CD28, CD38 et CD57 à chaque point du suivi.

Objectif 2 – Caractérisation du transcriptome des LT CD8 spécifiques de VIH

Les LT CD8 spécifiques du VIH ont été séquencés par single cell RNAseq (scRNAseq) pour caractériser le transcriptome de ces cellules et évaluer l'expression de gènes associés à l'épuisement, les fonctions effectrices et la stemness des LT CD8 à chaque point du suivi.

Objectif 3 – Évolution clonotypique des réponses LT CD8 spécifiques du VIH et évolution des séquences virales reconnues

Les régions CDR3 des chaînes α et β du TCR ont été séquencées pour observer l'évolution clonotypique des réponses LT CD8 spécifiques du virus au cours du temps. En parallèle le virus a été séquencé sur les épitopes reconnus pour offrir un aperçu unique de la coévolution entre la réponse LT CD8 et VIH pendant 27 ans d'infection naturelle et traitée.

Objectif 4 – Évaluation des propriétés fonctionnelles des LT CD8 spécifiques du virus

Nous avons utilisé une approche *in vitro* développée dans notre laboratoire pour évaluer la fonctionnalité et la capacité d'expansion des LT CD8 mémoires spécifiques du VIH après stimulation par des peptides viraux. Nous avons également pris avantage de ce modèle pour tester la capacité de divers cytokines et adjuvants prédéterminés à améliorer les caractéristiques fonctionnelles des LT CD8.

Chapitre II :

MATÉRIEL ET

MÉTHODES

1. Caractéristiques de la cohorte IMMUNOCO

152 individus infectés par VIH-1 ont été enrôlés pour une analyse prospective de la réponse LT CD8 spécifique de VIH-1 entre 1988 et 1993 et ont été suivis jusqu'en Décembre 1996. A l'inclusion, en médiane, l'âge des patients était de 35 ans, la durée de séropositivité connue de 49 mois, le ratio femme:homme de 1:4, les CD4 de 396/mm³ (115-1331) et la CV plasmatique de 4,4 log (2,3-6,5), 40% seulement étaient traités soit par monothérapie NRTI (39%) ou bithérapie (1%). La séropositivité à VIH a été confirmée par ELISA et Western Blot. Tous les patients ont signé un accord de consentement et le protocole a été approuvé par le Comité de Protection des Personnes de la Pitié-Salpêtrière. Les critères d'exclusions incluaient : âge inférieur à 18 ans, hémophilie, utilisateurs de drogues injectables ou traitement avec des inhibiteurs de protéase. Le traitement par antirétroviraux (mono ou bithérapie avec des analogues nucléotidiques de Novembre 1991 à Mars 1996) a été débuté en accord avec les pratiques cliniques locales. Une évaluation du taux de CD4 et de divers paramètres cliniques a été réalisée en routine tous les 2 à 3 mois. En 2015, sur les 152 patients initiaux de la cohorte, 30 sont décédés, 94 sont perdus de vue et 28 sont toujours suivis sur le site de la Pitié-Salpêtrière. La durée de suivi médiane pour les 28 patients est de 25 ans dont 15 sous trithérapies. Les échantillons consistent en PBMC congelés de 1988 à 2017 avec environ 3 à 9 prélèvements pour la plupart des patients. Huit patients ont été exclus par manque de prélèvement. Les données cliniques des 20 patients restants sont présentés dans le tableau 1.

Individus	EARLY	INT	LATE	Sexe	Année de naissance	Âge à EARLY	Âge à LATE	Suivi (année)	NADIR CD4 (Cellules/mm ³)	HLA-A	HLA-B
PS01	11/1991	01/1995	09/2016	M	1952	39	64	25	324	A*02	-
PS03	11/1991	11/1994	10/2016	M	1961	30	55	25	4	A*02	B*57
PS07	12/1991	02/1997	09/2016	M	1950	41	66	25	15		
PS14	01/1992	02/1997	08/2016	M	1953	39	63	24	180	A*03	B*35
PS17	03/1992	-	04/2017	M	1959	33	58	25	488*	A*02, A*03	-
PS18	02/1992	03/1997	10/2016	M	1959	33	57	24	79	-	-
PS23	02/1992	04/1996	01/2017	F	1957	35	60	25	109	A*02	-
PS24	02/1992	02/1996	10/2016	F	1939	53	78	25	166	A*02	B*08
PS31	07/1992	09/1997	08/2016	M	1956	36	61	25	85	A*02	-
PS34	04/1993	04/1995	04/2017	M	1960	33	57	24	1		
PS111	03/1988	-	12/2016	M	1943	45	74	29	260	-	B*08, B*57
PS112	02/1988	05/1990	09/2016	M	1955	33	62	29	133	A*03	B*07
PS114	03/1991	-	09/2016	F	1962	29	54	25	18	A*02	B*57
PS208	12/1993	02/1997	10/2016	M	1958	35	58	23	102	-	-
PS209	06/1991	01/1992	03/2017	M	1954	37	63	26	550	-	-
PS212	01/1992	05/1997	08/2016	M	1951	41	66	25	163	A*02	-
PS222	04/1995	-	03/2017	M	1964	31	53	22	120		
PS228	09/1991	06/1994	12/2016	M	1938	53	78	25	8	-	-
PS240	04/1991	-	10/2016	M	1955	36	62	26	136	-	-
PS248	11/1991	05/1997	10/2016	M	1957	34	59	25	211	-	-

Tableau 1 - Caractéristiques cliniques des 20 individus de la cohorte IMMUNOCO

2. Caractérisation phénotypique

2.1. Marquage de surface

Matériel et réactifs :

- Milieu RPMI + 10 % SVF (R10, Life Technologies)
- Sérum de veau fœtal (SVF, Life Technologies)
- Marqueur de viabilité LIVE/DEAD Fixable Aqua (ThermoFischer Scientific)
- Tétramère reconstitué avec un conjugué de Streptavidine et R-Phycoérythrine (SAPE, ThermoFischer Scientific).
- Cocktail d'anticorps de surface : CD8 (APC-Cy7, BD Biosciences), CD4 (BV650, BD Biosciences), CD45RA (V450, BD), CCR7 (PECy7, BD), CD27 (AF700, Ozyme), CD28 (PE-CF594, BD Biosciences), CD95 (FITC, BioLegend), CD38 (APC, BD), HLA-DR (PerCP-Cy5.5, BioLegend), CD57 (BV605, BD)
- Paraformaldéhyde 1 % (PFA)
- LSR Fortessa Cell Analyzer (BD Biosciences).

Protocole :

- Décongeler doucement les PBMC dans un bain marie à 37°C et laver deux fois les cellules avec du R10.
- Reprendre les cellules dans un volume approprié de PBS 1X et ajouter 10 uL du marqueur de viabilité LIVE/DEAD Fixable Aqua (ThermoFischer Scientific) dilué au 1/100 pendant 10 minutes à température ambiante.
- Laver puis marquer avec le tétramère-PE adéquat (voir partie Tétramère page 104) pendant 15 minutes à 37°C dans le noir.
- Ajouter le cocktail d'anticorps de surface et incuber pendant 15 minutes à température ambiante.
- Laver puis reprendre le culot cellulaire dans 200 uL de PFA à 1%.
- Analyser les cellules sur un LSR Fortessa Cell Analyzer (BD Biosciences).

2.2. Marquage intracellulaire

Matériel et réactifs :

- Milieu RPMI + 10 % SVF (R10, Life Technologies)
- SVF (Life Technologies)
- Marqueur de viabilité LIVE/DEAD Fixable Aqua (ThermoFischer Scientific)

- Tétramère reconstitué avec un conjugué de Streptavidine et R-Phycoérythrine (SAPE, ThermoFischer Scientific).
- Cocktail d'anticorps de surface : CD8 (APC-Cy7, BD), CD45RA (PCPCy5.5, eBioscience), CCR7 (PECy7, BD) et CD27 (AF700, Ozyme).
- Cocktail d'anticorps intracellulaire : Perforine (FITC, Ozyme), Eomes (PECF610, Thermo Fischer), Tbet (eFluor 660, eBioscience), Granzyme B (V450, BD).
- Kit *Transcription Factor Buffer set* (562574 BD)
- Paraformaldéhyde 1 % (PFA)
- LSR Fortessa Cell Analyzer (BD Biosciences).

Protocole :

- Décongeler doucement les PBMC dans un bain marie à 37°C et laver deux fois les cellules avec du R10.
- Reprendre les cellules dans un volume approprié de PBS 1X et ajouter 10 uL du marqueur de viabilité LIVE/DEAD Fixable Aqua (ThermoFischer Scientific) dilué au 1/100 pendant 10 minutes à température ambiante.
- Laver puis marquer avec le tétramère-PE adéquat (voir partie Tétramère page 104) pendant 15 minutes à 37°C dans le noir.
- Ajouter le cocktail d'anticorps de surface et incuber pendant 15 minutes à température ambiante.
- Ajouter 1 mL du tampon Fix/Perm dilué au 1/4 et incuber 40 minutes sur glace.
- Laver deux fois successivement avec 1 mL puis 2 mL de la solution Perm/Wash diluée au 1/5 dans de l'eau.
- Ajouter le cocktail d'anticorps intracellulaire et incuber 40 minutes sur glace.
- Laver les cellules avec 2 mL de la solution Perm/Wash diluée au 1/5 dans de l'eau puis reprendre les cellules dans 200 uL de PFA à 1%.
- Analyser les cellules sur un LSR Fortessa Cell Analyzer (BD Biosciences).

3. Tétramères

Les tétramères CMH-I ont été reconstitués avec un conjugué de Streptavidine et de R-Phycoérythrine (SAPE, ThermoFischer Scientific). Des tétramères ont été utilisés pour détecter les LT CD8 avec les spécificités suivantes : SLYNTVATL (SL9/HLA-A*0201), QVPLRPMTYK (QK10/HLA-A*0301), RLRPGGKKKY (RY10/HLA-A*0301), EIYKRWII (EI8/HLA-B*0801), FLKEKGGL (FL8/HLA-B*0801), KAFSPEVIPMF (KF11/HLA-B*5701), RPMTYKAAL (RL9/HLA-B*07), IPRRIRQGL (IL9/HLA-B*07) et TSTLQEQIGW (B57 TW10/HLA-B*5701) (Tableau 2).

HLA	Épitope	Protéine	Position	Séquence
A*03	RY10	Gag	20-29	RLRPGGKKKY
A*02	SL9	Gag	77-85	SLYNTVATL
B*08	EI8	Gag	260-267	EIYKRWII
B*57	KF11	Gag	162-172	KAFSPEVIPMF
B*57	TW10	Gag	240-249	TSTLQEQIGW
A*03	QK10	Nef	73-82	QVPLRPMTYK
B*08	FL8	Nef	90-97	FLKEKGGL
B*07	RL9	Nef	77-85	RPMTYKAAL
B*07	IL9	Env	843-851	IPRRIRQGL

Tableau 2 - Tétramères utilisés pour la détection des réponses LT CD8 spécifique du VIH-1

4. Mesure de la taille des télomères

4.1. Tri cellulaire par cytométrie en flux

Matériel et réactifs :

- R10 (Life Technologies)
- SVF (Life Technologies)
- Marqueur de viabilité LIVE/DEAD Fixable Aqua (ThermoFischer Scientific)
- Cocktail d'anticorps de surface : CD8 (Pacific Blue, BioLegend), CD4 (BUV395, BD), CD57 (BV605, BD), CD45RA (PercPCy5.5, eBioscience), CCR7 (PECF594, BD), CD27 (AF700, Ozyme), CD14 (PE, BioLegend), CD34 (FITC, BD), CD10 (AP-CCy7, BioLegend) et CD117 (PECy7, BioLegend).

Protocole :

- Décongeler les PBMC dans du R10 chaud et laver deux fois les cellules avec du R10.
- Introduire les cellules dans un tube FACS et ajouter 10µL du marqueur de viabilité dilué au 1/100.
- Incuber 15 minutes à température ambiante puis laver avec du PBS 1X.
- Marquer les cellules avec le panel d'anticorps de surface et incuber pendant 15 minutes à température ambiante.
- Laver les cellules avec 2 mL de PBS 1X puis reprendre le culot dans 300 mL de R10.
- Trier les sous-populations en fonction de l'expression des marqueurs suivants :
 - **Progéniteurs hématopoïétiques (CD34+)** : CD14- CD4- CD8- CD34+
 - **LT CD8 naïfs** : CD45RA+ CCR7+ CD27+ CD8+
 - **LT CD4 naïfs** : CD45RA+ CCR7+ CD27+ CD4+
 - **LT CD8 M57+** : CD45RA+/- CCR7 +/- CD27- CD57+ CD8+
- Stocker les cellules triées sous forme de culot sec.
- Le nombre de cellules triées pour chaque individu à chaque TP est indiqué dans le tableau ci-dessous :

Individu – TP	LT CD8 naïf	LT CD8 MEM57+	LT CD4 naïf	CD34+
PS01 – EARLY	6000	6000	6000	2096
PS01 – INT	4640	6000	6000	6084
PS01 – LATE	533	6000	6000	224
PS03 – EARLY	6000	6000	6000	252
PS03 – INT	5303	6000	6000	2242

PS03 – LATE	6000	6000	6000	588
PS07 – EARLY	2000	2000	2000	1010
PS07 – INT	4000	4000	4000	1648
PS07 – LATE	4000	4000	4000	1007
PS14 – EARLY	4000	4000	4000	963
PS14 – INT	4000	4000	4000	1003
PS14 – LATE	4000	4000	4000	300
PS17 – EARLY	6000	6000	6000	715
PS17 – LATE	1324	6000	6000	101
PS18 – EARLY	6000	6000	6000	1618
PS18 – INT	6000	6000	6000	1127
PS18 – LATE	6000	6000	6000	606
PS23 – EARLY	6000	6000	6000	692
PS23 – INT	3237	6000	5701	121
PS23 – LATE	303	4643	1011	1
PS24 – EARLY	6000	6000	6000	554
PS24 – INT	5701	6000	6000	478
PS24 – LATE	6000	6000	6000	228
PS31 – EARLY	6000	6000	6000	510
PS31 – INT	6000	6000	6000	1107
PS31 – LATE	6000	6000	6000	904
PS34 – EARLY	6000	6000	6000	1806
PS34 – INT	6000	6000	5287	31
PS34 – LATE	3172	6000	6000	132

4.2. Extraction et purification de l'ADN génomique

Matériel et réactifs :

- Kit Nucleospin tissue (Takara)
 - o Tampon T1
 - o Protéinase K
 - o Tampon B3
 - o Tampon B5
 - o Tampon d'élution
 - o Colonne
- Éthanol 70%
- Éthanol 100%
- RNase AWAY (Fischer)
- Bloc chauffant
- Vortex/Centrifugeuse
- Tube Eppendorf (Dutscher)
- Nanodrop

Protocole :

- Laver la paillasse avec l'éthanol à 70% et le RNase AWAY.
- Resuspendre le culot de cellules triés dans 80µL de tampon T1 et ajouter 8µL de protéinase K.
- Mélanger 3 fois, vortexer, centrifuger rapidement puis incuber les tubes 10 minutes à 56°C.
- En parallèle préparer les colonnes en les déposant dans des tubes Eppendorf.
- Récupérer les tubes à 56°C et ajouter 80µL de tampon B3. Vortexer puis centrifuger rapidement.
- Incuber les tubes 5 minutes à 70°C puis laisser refroidir 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 80µL d'éthanol à 100% dans chaque tube puis vortexer et centrifuger rapidement.
- Ajouter l'échantillon sur la colonne et centrifuger 1 minute à 10 000 rpm.
- Jeter le tube d'élution et mettre la colonne sur un nouveau tube Eppendorf.
- Ajouter 50µL du tampon B5 et centrifuger 1 minute à 10 000 rpm.
- Ajouter 50µL du tampon B5 et centrifuger 2 minutes à 10 000 rpm.
- Jeter le tube d'élution et placer la colonne sur un nouveau tube Eppendorf.
- Ajouter 20µL du tampon d'élution et centrifuger 1 minute à 10 000 rpm.
- Vérifier la pureté de l'ADN extrait avec le Nanodrop (le ratio 260/280nm doit être entre 1,5 et 2).
- Enlever la colonne et stocker le tube contenant l'ADN génomique extrait à -20°C.

4.3. Déterminer la taille des télomères par qPCR

La taille relative des télomères (RTL, *relative telomere length*) d'échantillon d'ADN génomique est évaluée par qPCR. On compare le nombre de répétitions télomériques de l'échantillon avec le nombre de copies du gène de ménage 36B4 codant pour la sous-unité ribosomale appelé RPLP0. Cette comparaison permet d'obtenir un ratio T/S, T pour le nombre de copies de répétitions télomériques et S pour le nombre de copies de 36B4, qui est proportionnel à la taille moyenne des télomères ⁴³⁵.

Pour y parvenir on réalise deux qPCR en parallèle, l'une pour 36B4 et l'autre pour les télomères. On utilise comme contrôle une gamme d'ADN génomique de 293T de concentrations décroissantes. Cette gamme permet de générer deux courbes standards à partir des valeurs de Ct, l'une pour le gène 36B4 et l'autre pour les télomères (Figure 21). A partir de ces courbes il est possible d'extrapoler les valeurs S (36B4) et T (télomère) pour chaque

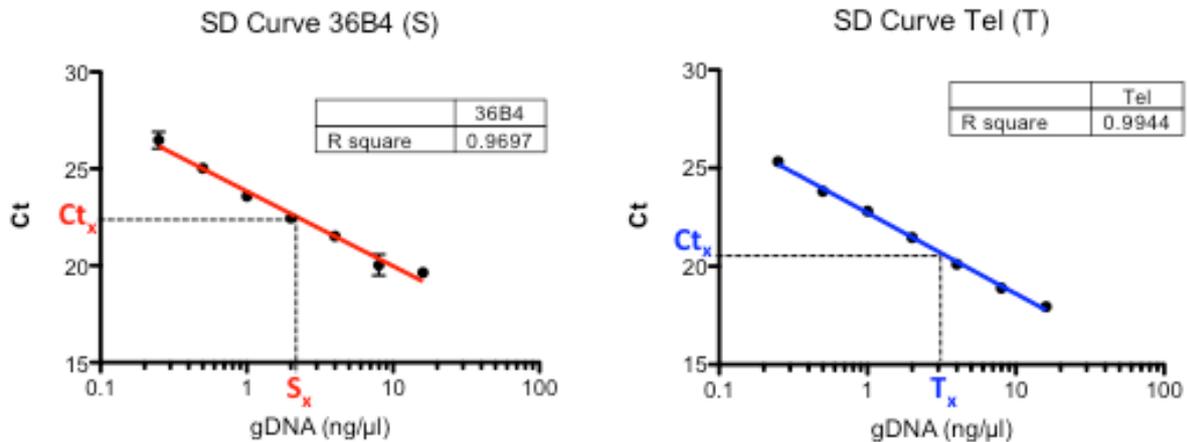


Figure 21 - Principe du telomere length assay – Estimation des facteurs S et T à partir des courbes étalons de 293T.

échantillon. On est alors en mesure de calculer un ratio T/S propre à chaque échantillon à partir duquel on peut déterminer la taille des télomères en kilobases (kb) selon la formule suivante : $kb = 6.2303 \times (T/S) - 1.2176$ (La formule a été obtenue à partir d'un Southern Blot dont la taille des bandes a été corrélée avec les TRF correspondant).

Matériel et réactifs :

- Amorces télomère sens (10 μ M) :
5'CGGTTTGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTT3'
- Amorces télomère anti-sens (10 μ M) :
5'GGCTTGCCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT3'
- Amorces 36B4 sens (10 μ M) : 5'CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC3'
- Amorces 36B4 anti-sens (10 μ M) : 5'CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA3'
- Éthanol 70%
- RNase Zap (Sigma Aldrich)
- Eau sans nucléase (Thermo Fischer)
- Power SYBR Green Master Mix (Thermo Fischer)
- Microplaques qPCR (Dutscher)
- ADN génomique contrôle de la lignée cellulaire 293T

- ADN génomique extrait des sous-populations cellulaires triées

Protocole :

- Nettoyer la paillasse avec l'éthanol à 70% et le RNase Zap.
- A partir de l'ADN génomique contrôle des 293T préparer une gamme de dilution d'ADN (64, 32, 16, 8, 4, 2 et 1 ng/μL).
- Diluer l'ADN génomique des échantillons à tester de manière à obtenir des concentrations en ADN proche de 2ng/μL.
- Pour chaque échantillon de la gamme de 293T et des échantillons à tester, déposer 5μL d'ADN génomique en duplicata sur deux microplaques qPCR : une pour les télomères et une pour le gène de ménage 36B4.
- Dans chaque puits ajouter le mix suivant
 - Power SYBR Green – 12,5μL
 - Amorces sens – 1μL
 - Amorces anti-sens – 1μL
 - Eau sans nucléase – 5,5μL
- Lancer la PCR en utilisant les programmes suivants :

Télomère		
Cycle	Temp (°C)	Temps
1	50	2 min
1	95	10 min
30	95	15 sec
	56	2 min
	72	1 min

36B4		
Cycle	Temp (°C)	Temps
1	50	2 min
1	95	10 min
40	95	15 sec
	58	1 min

- Générer une courbe standard en utilisant les valeurs de Ct pour 36B4 et pour les télomères.
- Extrapoler les valeurs T et S pour obtenir un ratio T/S propre à chaque échantillon.

5. Single cell RNA sequencing – SMARTseq v4 Ultra Low input RNA

5.1. Principe du SMARTseq v4 Ultra Low input RNA

Dans un premier temps l'ARN est purifié à partir d'un lysat cellulaire. La purification fait intervenir des billes magnétiques se fixant spécifiquement sur l'ARN et une série de lavages avec de l'éthanol à 80% pour éliminer les composants cellulaires indésirables. Une fois l'ARN purifié, l'amorce Oligo-dT₃₀VN se fixe sur toutes les queues poly(A) des ARN messagers (Figure 23 Étape 1). La RT SMARTScribe utilise l'amorce pour initier la synthèse du premier brin d'ADN complémentaire (ADNc). Lorsque la RT atteint l'extrémité 5' de l'ARN, son activité terminale transférase lui permet d'ajouter quelques nucléotides supplémentaires qui serviront pour la fixation de l'amorce TSO (Figure 23 Étape 2). La fixation de l'amorce TSO rallonge le brin d'ARN et permet à la RT de continuer l'élongation en se servant du TSO comme modèle. La région supplémentaire synthétisée sert alors de site de fixation pour l'amorce ISPCR (Figure 23 Étape 3). La RT change de brin et se sert de l'amorce ISPCR pour initier l'élongation du deuxième brin d'ADNc. Le produit final d'ADNc est amplifié en prévision de la préparation de la librairie (Figure 23 Étape 4). La qualité de l'ADNc amplifié est vérifiée sur un Bioanalyzer 2100 (Agilent). Une librairie d'ADNc de bonne qualité ne contient pas de fragments inférieurs à 500 bp et montre un pic autour de 1,5~2 kb (Figure 23 B).

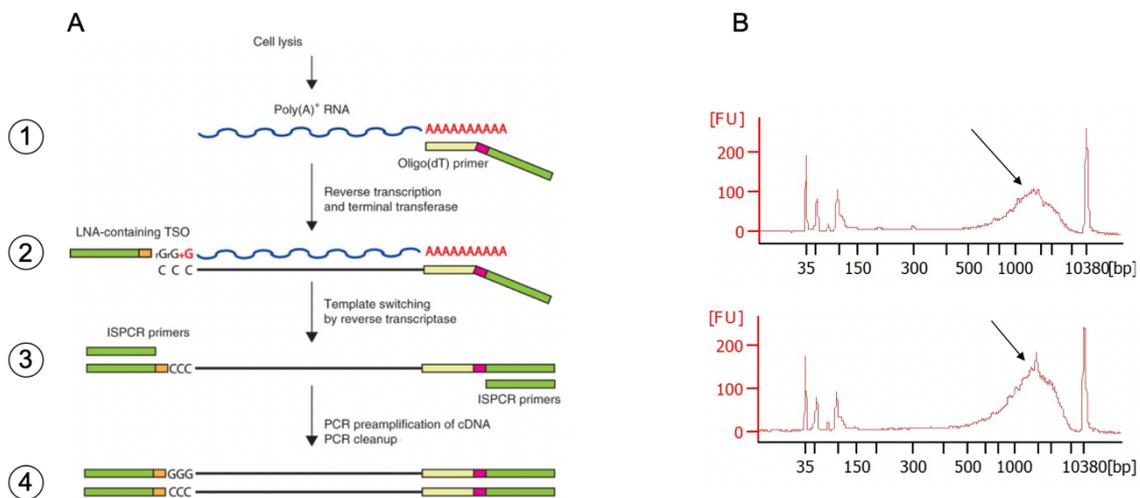


Figure 22 - Amplification de l'ADNc à partir des ARNm. (A) Synthèse d'ADNc par la RT SMARTScribe. (B) Analyse des librairies d'ADNc générées par Bioanalyzer.

Si les ADNc sont d'une qualité convenable on peut commencer à préparer les bibliothèques pour le séquençage. La préparation de la bibliothèque fait intervenir le kit d'Illumina *Nextera XT DNA Library Prep Kit*. La première étape est une réaction de tagmentation qui consiste à fragmenter et à marquer l'ADN avec des adaptateurs/index en une seule réaction rapide. Chaque puits, et donc chaque cellule unique, est marqué avec un couple d'index différents (Figures 24 A&B). Après amplification des produits par PCR, la qualité de la bibliothèque est évaluée une nouvelle fois sur un Bioanalyzer. Une tagmentation optimale génère des fragments d'ADN d'une taille comprise entre 300 et 800 paires de base (Figure 24C) ⁴³⁶.

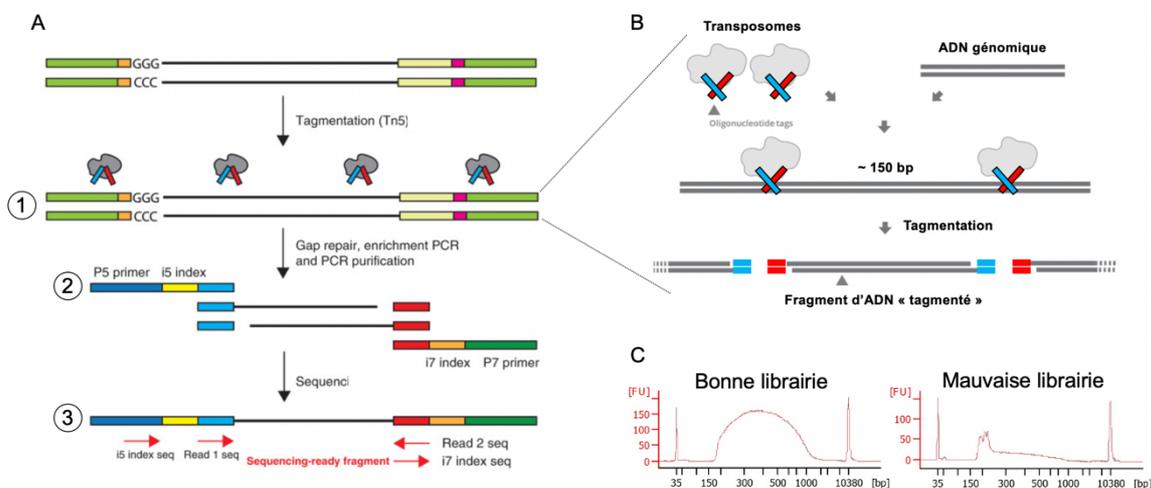


Figure 23 - Réaction de tagmentation de l'ADNc. (A & B) Réaction de tagmentation et incorporation des séquences indexes dans les fragments générés. (C) Représentation d'une bonne librairie composée de fragments de 400 pb en moyenne et d'une mauvaise librairie où la réaction de tagmentation a fragmenté l'ADNc en des segments trop petits. Picelli et al & Guide Nextera XT DNA Library Prep Kit

Enfin, la concentration des bibliothèques est évaluée par qPCR (KAPA Library Quantification Kit, roche) et les échantillons dilués à 2nM chacun. Les bibliothèques sont regroupées et l'ensemble est envoyé à séquencer sur un HiSeq4000 en *paired-end*. Les protocoles sont détaillés dans les parties suivantes.

5.2. Tri cellulaire par cytométrie en flux

Matériel et réactifs :

- Milieu RPMI + 10 % SVF (R10, Life Technologies)
- Sérum de veau foetal (SVF, Life Technologies)
- Marqueur de viabilité LIVE/DEAD Fixable Aqua (ThermoFischer Scientific)
- Tétramère reconstitué avec un conjugué de Streptavidine et R-Phycoérythrine (SAPE, ThermoFischer Scientific).
- Cocktail d'anticorps de surface : CD8 (APC-Cy7, BD Biosciences), CD4 (BV650, BD), CD45RA (V450, BD), CCR7 (PECy7, BD), CD27 (AF700, Ozyme), CD28 (PE-CF594, BD), CD95 (FITC), CD38 (APC, BD), HLA-DR (PerCP-Cy5.5, BioLegend), CD57 (BV605, BD)
- Tampon de lyse (Takara)
- BD FACSAria II cell sorter (BD Biosciences)

Protocole :

- Décongeler doucement les PBMC (10 à 20.10⁶ de cellules) dans un bain marie à 37°C et laver deux fois les cellules avec du R10.
- Reprendre les cellules dans un volume approprié de PBS 1X et ajouter 10 uL du marqueur de viabilité LIVE/DEAD Fixable Aqua (Thermo Fischer Scientific) dilué au 1/100 pendant 10 minutes à température ambiante.
- Laver puis marquer avec le tétramère-PE adéquat (voir partie Tétramère) pendant 15 minutes à 37°C dans le noir.
- Ajouter le cocktail d'anticorps de surface et incuber pendant 15 minutes à température ambiante.
- Laver puis reprendre le culot cellulaire dans 200 uL de R10.
- Trier par FACS les cellules tétramères + directement dans une plaque 96 puits contenant du 5µL tampon de lyse, à raison d'une cellule par puits.
- Placer immédiatement les plaques sur carboglace avant de les conserver à -80°C en prévision des futures étapes.
- Le nombre de cellules triées pour chaque condition est indiqué figure 22.

	Early	Int	Late	HIV-2	Total
PS03	95	93	72	-	260
PS14	95	95	95	-	285
PS24 – EI8	95	93	90	-	278
PS24 – FL8	95	52	91	-	238
PS212	92	94	89	-	275
VIH-2 (JFFT)	-	-	-	90	90
VIH-2 (XQXH)	-	-	-	82	82
TOTAL	472	427	437	172	1508

Figure 24 - Nombre de LT CD8 tétramères + triés pour chaque condition

5.3. Extraction, amplification de l'ARNm et synthèse de l'ADNc

Matériel et réactifs :

- RNAClean XP beads (A63987)
- Eau sans nucléase (Nuclease free water)
- Recombinant RNase Inhibitor (2313A)
- 10X Lysis Buffer (635013)
- Amorces Oligo-dT₃₀VN (IDT)
- Amorces TSO (IDT)
- Amorces ISPCR (IDT)
- Éthanol 80%
- SMARTScribe Reverse Transcriptase (639538)
- dNTP Mix (10mM)
- DTT (100mM)
- SeqAmp DNA Polymerase (638509)
- Agencourt AMPure XP beads (A63881)
- Thermocycleur
- Bioanalyzer 2100 (Agilent)
- Kit *High-sensitivity DNA chip* (Agilent)

Protocole :

- Incuber les RNAClean XP beads à température ambiante pendant 30 minutes avant utilisation.
- Préparer les solutions suivantes :

Tampon de réaction	
Réactif	Volume (uL)
Tampon de lyse (10X)	19
Recombinant RNase Inhibitor	1

Tampon CLM (Cell Lysis Mix)	
Réactif	Volume (uL)
Tampon de réaction	1
Eau sans nucléase	8
Oligo-dT ₃₀ VN (12uM)	1

- Décongeler les lysats cellulaires sur glace (plaques stockées à -80°C après le tri) et centrifuger rapidement à 800g pendant 1 minute.
- Vortexer les billes *RNAClean XP beads* et en ajouter 2,2 uL à chaque lysat cellulaire (dans chaque puits). Incuber pendant 10 à 15 minutes à température ambiante.
- Placer la plaque sur un aimant et incuber pendant 5 minutes (ou jusqu'à ce que le surnageant soit clair).
- A l'aide d'une pipette retirer doucement le surnageant en prenant garde à ne pas enlever de billes.
- Ajouter 75 uL d'éthanol à 80 % dans chaque puits.
- Attendre 30 secondes, puis retirer délicatement le surnageant d'éthanol avec une pipette.
- Répéter les 2 étapes précédentes pour faire 3 lavages.
- Incuber 2 minutes à température ambiante pour laisser l'éthanol s'évaporer.
- Enlever la plaque de l'aimant et éluer les billes dans 10 uL du tampon CLM déjà préparé. Incuber à température ambiante pendant 2 minutes.
- Incuber 3 minutes à 72°C puis immédiatement mettre la plaque sur glace pendant 2 minutes.
- Préparer la solution MM (*Master Mix*) :

Réactif	Volume (uL)
5X Ultra Low First-Strand Buffer	4
TSO (48 uM)	1
Recombinant RNase Inhibitor (40U/uL)	0.5

SMARTScribe Reverse Transcriptase	2
dNTP Mix (10mM)	2
DTT (100mM)	0.5

- Ajouter 10 uL de la solution MM à chaque échantillon, mélanger avec la pipette puis centrifuger brièvement. Incuber 90 minutes à 40°C puis 10 minutes à 70°C.
- Pendant ce temps préparer le mix PCR :

Réactif	Volume
2X SeqAmp PCR Buffer	25
PCR Primer II A (12uM)	1
SeqAmp DNA Polymerase	1
Eau sans nucléase	3

- Ajouter 30 uL du mix PCR à chaque échantillon, mélanger avec les pipettes et centrifuger brièvement. Lancer la PCR avec le programme suivant :

Étape	Cycle	Température (°C)	Durée
1	1	95	1 min
2	18	98	10 sec
		65	30 sec
		68	3 min
3	1	72	10 min
4	1	4	-

- Ajouter 50 uL des billes SPRI (Agencourt AMPure XP beads), mélanger avec la pipette et incubé 15 minutes.
- Placer la plaque sur un aimant et retirer le surnageant. Ajouter 200 uL d'éthanol 80%, attendre 30 secondes et retirer le surnageant. Répéter pour faire 3 lavages.
- Enlever l'aimant et ajouter 20 uL de tampon d'éluion (Eau sans nucléase).
- Vérifier la qualité des ADNc amplifiés sur un Bioanalyzer 2100 avec le kit *High-sensitivity DNA chip*

5.4. Préparation de la librairie

Matériel et réactifs :

- ADNc amplifié pendant l'étape précédente
- Qubit 3 (HS dsDNA Assay, Thermo Fischer)
- Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina)
 - Tampon TD (Tagment DNA Buffer)
 - Tampon ATM (Amplicon Tagment Mix)
 - Tampon NT (Neutralize Tagment Buffer)
 - Tampon NPM (Nextera PCA Master Mix)
- Nextera XT Index Kit v2 Set A (Illumina)
- Thermocycleur
- AMPure XP beads (Beckman)
- Eau sans nucléase
- Bioanalyzer 2100 (Agilent)
- Kit *High-sensitivity DNA chip* (Agilent)
- KAPA Library Quantification Kit (Roche)

Protocole :

- Quantifier l'ADNc amplifié par Qubit et diluer les échantillons à 0,2 ng/μL.
- Préchauffer le thermocycleur à 55°C.
- Déposer 1,25 μL des échantillons dans une autre plaque 96 puits.
- Ajouter 2,5 μL de tampon TD.
- Ajouter 1,25 μL de tampon ATM pour initier la réaction de tagmentation.
- Incuber 10 minutes à 55°C.
- Centrifuger rapidement et ajouter immédiatement 1,25 μL du tampon NT pour arrêter la réaction.
- Mélanger avec la pipette et incuber 5 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 1 minute à 800g et ajouter 2,5 μL d'adaptateurs (1,25 μL N7 et 1,25 μL S5).
- Ajouter 3,75 μL du tampon NPM
- Mélanger avec la pipette et centrifuger 1 minute à 800g.
- Amplifier les librairies avec le programme suivant :

Étape	Cycle	Température (°C)	Durée
1	1	72	3 min
2	1	95	30 sec
3	12	95	10 sec
4		50	30 sec
5		72	60 sec
6	1	72	5 min

- Ajouter 12,5 µL d'eau sans nucléase aux 12,5 µL d'échantillons dans chaque puits et ajouter 20 µL des billes AMPure XP SPRI beads (ratio 0.9 dans le puits). Incuber 30 minutes à température ambiante.
- Placer la plaque sur un support magnétique et laver 3 fois avec de l'éthanol à 80 %.
- Enlever la plaque du support magnétique et éluer les échantillons dans 20 µL d'eau.
- Vérifier la qualité des librairies sur un Bioanalyzer 2100 avec le kit *High-sensitivity DNA chip*
- Quantifier les librairies par qPCR avec le kit *KAPA Library Quantification* (Roche) avec le programme suivant :

Étape	Cycle	Température (°C)	Durée
1	1	95	5 min
2	35	95	30 sec
3		60*	45 sec*

- Calculer la molarité des librairies à partir de la concentration déterminée par qPCR et de la taille moyenne des librairies sur le Bioanalyzer 2100.
- Ajuster la molarité à 2nM puis vérifier par Qubit la concentration finale. Diluer à nouveau si nécessaire.
- Regrouper les librairies dans un même tube.
- Séquencer les librairies sur un HiSeq4000 avec une stratégie *paired-end*.

6. Traitement des données de scRNAseq

Les données brutes du séquençage sous format fastq ont été nettoyées avec Trimmomatic pour enlever les séquences d'adapteurs/index et les régions de mauvaise qualité. Les séquences restantes ont été alignées sur le génome de référence hg38 avec STAR en utilisant la commande :

```
STAR --outReadsUnmapped Fastx --outSAMtype BAM SortedByCoordinate --outSAMstrandField
intronMotif --outFilterIntronMotifs RemoveNoncanonical
```

La matrice d'expression des gènes a été générée avec FeatureCounts à partir des fichiers .bam générés par STAR via la commande :

```
$ featureCounts -p -O -T n -a example_genome_annotation.gtf -o example_featureCounts_output.txt
sorted_example_alignment.bam.
```

Contrôle qualité

Le QC a été effectué dans R (v4.2.1) avec le package scater en utilisant trois métriques : la taille de la librairie, le nombre de gènes exprimés et le pourcentage de gènes mitochondriaux. Les cellules avec des valeurs aberrantes pour chacune de ces caractéristiques ont été détectées en fonction de l'écart médian absolu (MAD, *absolute median deviation*). Les cellules avec une valeur supérieure à 3 fois la MAD sont considérées comme aberrantes et éliminées de l'analyse. Des limites fixes ont également été utilisées : les cellules avec moins de 500 gènes ou plus de 5000 gènes ont été éliminées. Après QC, 508 cellules sur les 1508 initiales sont retenues. Les échantillons de PS14 à EARLY et INT ont également été retirés de l'analyse car le marquage tétramère + s'est avéré non-spécifique (Figure 25, Annexe 3).

	Early	Int	Late	HIV-2	Total
PS03	34	0**	39	-	73
PS14	0*	0*	82	-	82
PS24 – E18	62	0**	60	-	122
PS24 – FL8	53	0**	55	-	108
PS212	0**	0**	0**	-	0
VIH-2 (JFFT)	-	-	-	70	70
VIH-2 (XQXH)	-	-	-	53	53
TOTAL	115	0	236	123	508

* Marquage tétramère non spécifique ** Qualité contrôlée

Figure 25 - Nombre de cellules retenues après QC pour chaque condition

Normalisation et détection des DEG

La normalisation a été effectuée sur les cellules restantes avec le package `scran` qui implémente une stratégie de déconvolution⁴³⁷. Les gènes différentiellement exprimés (DEG) ont été détectés avec la fonction `FindMarkers` du package `scran` avec un test de Wilcoxon non apparié. Une p-value corrigée par le FDR inférieur à 0.05 est considérée comme significative.

Réduction de la dimension et visualisation des données :

Les PCA et UMAP ont été générées avec la fonction `plotReducedDim` du package `scater`. La dimensionnalité des deux jeux de données a été réduite en sélectionnant les 8 premières composantes principales (PC). Le nombre de PC à garder a été choisi en fonction de l'*elbow point* (point du coude). Puisque les premières PCs capturent la majorité du signal biologique celles-ci devraient expliquer plus de variance que les PCs suivantes. Il existe donc une diminution rapide de la variance expliquée par chaque PC une fois que l'on dépasse les dernières PCs « biologiques ». Cela se manifeste par un coude sur le diagramme d'éboulis (scree plot) qui sert de choix pour le nombre de PC à retenir. Les Violin-plot ont été générés avec la fonction `VlnPlot` de Seurat. Les Heatmaps et volcano plot ont été générés avec les packages `pheatmap` et `ggplot2`. La détection des voies de signalisation a été effectuée avec l'algorithme GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) du Broad Institute et le package `fgsea`. L'analyse sPLS-DA a été faite avec le package `mixOmics`⁴³⁸.

7. Analyse clonotypique

Les séquences CDR3 des chaînes α et β du TCR ont été reconstruites à partir des fichiers `fastq` bruts avec `MiXCR` (bash) en utilisant les paramètres `-s has -p rna-seq -OallowPartialAlignments=true`. Brièvement, `MiXCR` aligne les reads avec les gènes V, D, J et C référence du TCR. L'assemblage de multiples séquences permet de reconstruire les chaînes du TCR dans leur globalité et d'identifier les régions CDR3 hypervariables⁴³⁹. Les cellules présentant plus d'une chaîne β ont été retirées de l'analyse avec la fonction `decontaminate` de `vdjtools` (bash). Les CIRCOS plot montrant l'utilisation des gènes du TCR ont été générés avec la fonction `PlotFancyVJUsage` de `vdjtools`. La représentation de l'évolution de la région CDR3 pour les chaînes α et β a été générée avec la fonction `trackClonotypes` du package `Immunarch` dans R.

8. Amplification et séquençage Sanger de Gag et Nef

Matériel et réactifs :

- ADN génomique extrait à partir de PBMC totaux
- Taq Polymerase ThermoStar 2 (Eurobio)
- Exosap (Thermo Fischer)
- Eau sans nucléase
- Analyseur automatique d'ADN/ARN - QIAxcel
- Les amorces suivantes pour Gag et Nef (20µM) :

GAG1-First PCR 1st amplicon: 5'-GACTAGCGGAGGCTAGAA-3' (HXB2 764-781) and 5'-TTTGGTCCTTGTCTTATGTCCAGA-3' (HXB2 1635-1658).

GAG2-First PCR 2nd amplicon: 5'-ATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAATT-3' (HXB2 1544-1572) and 5'-ATGCTTTTATTTTTTCTTCTGTCAATGGC-3' (HXB2 2621-2650).

GAG1A-Second PCR: 5'-GACTAGCGGAGGCTAGAA-3' (HXB2 764-781) and 5'-GTTCTAGGTGATATGGCCTGATG-3' (HXB2 1219-1241).

GAG1B-Second PCR: 5'-CACCTAGAACTTTAAATGCATGGGT-3' (HXB2 1232-1256) and 5'-TTTGGTCCTTGTCTTATGTCCAGA-3' (HXB2 1635-1658).

GAG2A-Second PCR: 5'-ATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAATT-3' (HXB2 1544-1572) and 5'-AGGGGTCGTTGCCAAAGA-3' (HXB2 2264-2281).

GAG2B-Second PCR: 5'-TCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCA-3' (HXB2 2136-2163) and 5'-ATGCTTTTATTTTTTCTTCTGTCAATGGC-3' (HXB2 2621-2650).

Nef-First PCR: 5'-GCCACAGCCATAGCAGTAGCTGAGGGG-3' (HXB2 8673-8699) and 5'-CCAGTACAGGCAAAAAGCAGCTGCTTATA-3' (HXB2 9511-9540).

Nef-Second PCR: 5'-CCTAGAAGAATAAGACAGGGCTTGAAAG-3' (HXB2 8754-8782) and 5'-ACGCCTCCCTGGAAAGTCCCCAGCGG-3' (HXB2 9443-9468).

Protocole :

- Préparer le mix et lancer la première PCR d'amplification avec les amorces appropriées :

Réactif	Volume (µL)
Reaction Mix 5X	5
Amorce 5'	1
Amorce 3'	1
Taq Polymerase	0,25
Eau sans nucléase	15,75
ADN	2

Nbr cycles	Temp (°C)	Durée
1	94	7 min
40	94	30 sec
	55 (GAG2, NEF) 62 (GAG1)	30 sec
	72	1 min
	72	7 min

- Lancer la deuxième PCR d'amplification avec les amorces appropriées (même mix et même programme PCR).
- Vérifier la pureté et la qualité de l'amplification sur le QIAxcel.
- Si la qualité est convenable purifier les produits de PCR à partir du kit Exosap : 10µL d'échantillon PCR + 4µL d'Exosap. Lancer un cycle PCR à 37°C pendant 15 minutes et 1 cycle à 80°C pendant 5 minutes.
- Lancer la réaction pour le séquençage des amplicons :

Réactif	Volume (µL)
Enzyme Big Dye	1
Tampon 5X	3,5
Amorce (3,2µM)	1
Amplicon	2
Eau sans nucléase	12,5

Nbr cycles	Temp (°C)	Durée
1	94	7 min
40	94	30 sec
	55 (GAG2, NEF) 62 (GAG1)	30 sec
	72	1 min
	72	7 min

- Séquencer les produits finaux sur un *Applied Biosystems 3500 xls Dx Genetic Analyzer*
- Analyser les séquences avec le logiciel IDNS version v3_12_0r1(r32526) Smartgene (Figure 26).

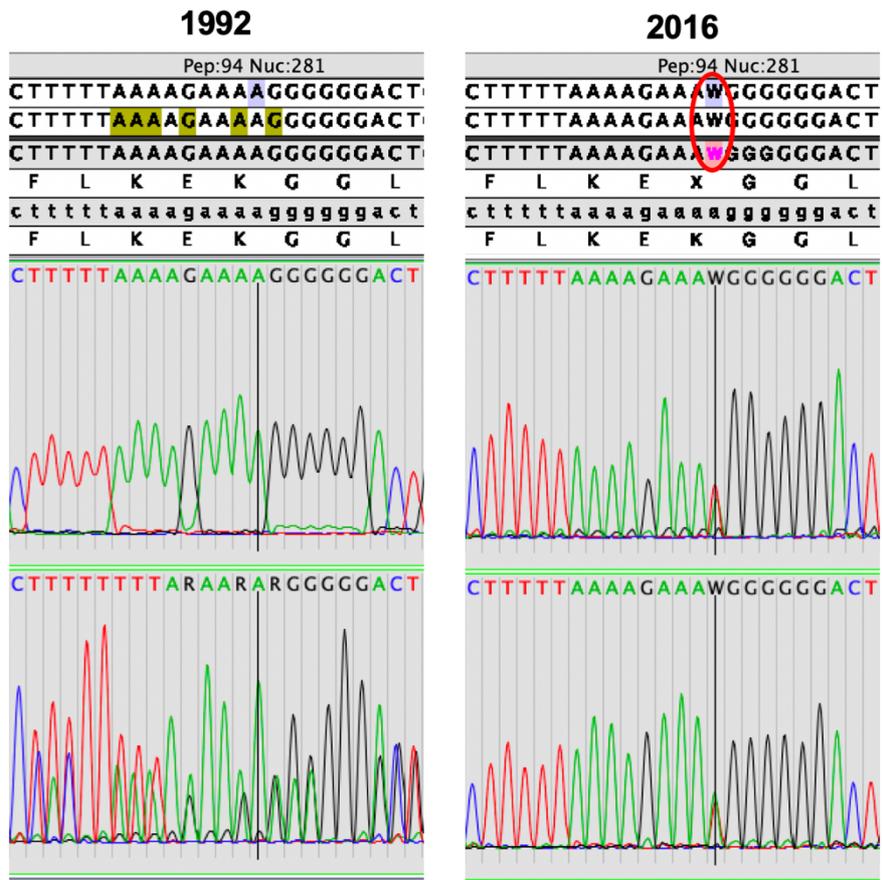


Figure 26 - Analyse de la séquence de l'épitope FL8 chez l'individu PS14 en 2016.

9. Protocole du Boosting

Le modèle du *priming* est une approche de coculture *in vitro* à partir de PBMC totaux initialement conçue dans notre laboratoire pour étudier l'induction de réponses LT CD8 à partir de précurseurs naïfs ^{440,441}. Le rationnel de l'approche repose sur la capacité des DCs à induire des réponses LT CD8 en présentant l'antigène via le CMH-I (signal 1), en fournissant des signaux de costimulation (signal 2) et en produisant des cytokines inflammatoires (signal 3). Dans ce modèle l'ajout de cytokines/adjuvants vise à optimiser l'expansion et l'acquisition de fonctions effectrices des LT CD8, soit en agissant directement sur ces cellules, soit en modulant les fonctions des DCs. L'utilisation de certains adjuvants, comme des agonistes de *Toll-like receptor* (TLR), permet d'augmenter l'immunogénicité de peptides antigéniques en imitant des signaux de dangers normalement fournis par des pathogènes ^{442,443}. Ce protocole a été adapté pour étudier l'induction de réponses LT CD8 à partir de cellules mémoires (*Boosting*) (Figure 27).

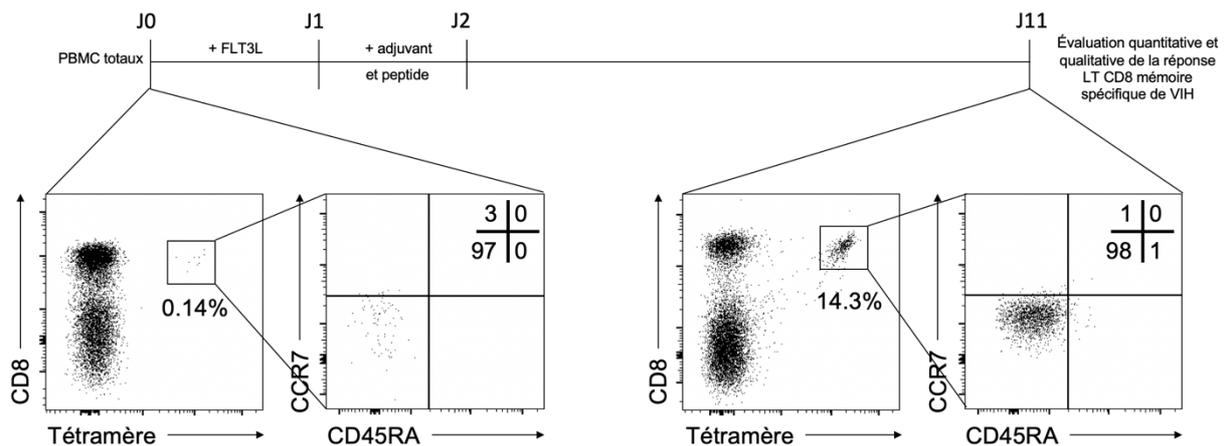


Figure 27 – Représentation schématique du modèle du Boosting

Plusieurs cytokines et adjuvants ont été présélectionnés en fonction de leur efficacité dans le modèle du priming :

- GMP-AMP cyclique (**cGAMP**) – agoniste de STING impliqué dans la production d'IFN de type I.
- Ligand de TLR8 (**TLR8L**) – TRL endosomal impliqué dans la reconnaissance d'ARN viraux simple brin.
- Q-VD-OPH (**QVD**) – Anti-apoptotique, inhibiteur irréversible de pancaspase ⁴⁴⁴.
- **IL-12** – Cytokine pro-inflammatoire.

- **IL-15** – Cytokine impliquée dans la prolifération homéostatique des LT CD8 mémoires.
- **IFN α**

Matériel et réactifs :

- Milieu RPMI + 10 % SVF (R10, Life Technologies)
- Milieu AIM-V (Invitrogen)
- SVF (Life Technologies)
- FLT3L (*FMS-like tyrosine kinase 3 ligand*, Gibco)
- Peptides viraux: SLYNTVATL (SL9/HLA-A*0201), QVPLRPMTYK (QK10/HLA-A*0301), RLRPGGKKKY (RY10/HLA-A*0301), EIYKRWII (EI8/HLA-B*0801), FLKEKGGL (FL8/HLA-B*0801), KAFSPEVIPMF (KF11/HLA-B*5701), RPMTYKAAL (RL9/HLA-B*07), IPRRIRQGL (IL9/HLA-B*07) et TSTLQEQIGW (B57 TW10/HLA-B*5701) (Biosynthesis, > 95 % de pureté).
- Cytokine et adjuvant prédéterminés
- Plaque 48 puits (Dutscher)

Protocole

- J0 : Les PBMC sont resuspendus dans du milieu AIM-V supplémenté de FLT3L à 50 ng/mL à raison de $4 \cdot 10^6$ de cellules/mL. Disposer de 250 μ L de la solution dans une plaque 48 puits de manière à déposer $1 \cdot 10^6$ de cellules par puits.
- J1 : La maturation des DCs est induite par l'ajout de cytokines ou adjuvants prédéterminés (cGAMP – 10 μ g/mL, TRL8L – 1 μ g/mL, QVD – 10 μ M, IL-12 – 100ng/mL, IL-15 – 100ng/mL, IFN α – 100ng/mL). En fonction du HLA du patient, le peptide immunodominant de VIH-1 est ajouté en même temps à une concentration finale de 0,1 μ M.
- J2 : Ajouter du SVF dans chaque puits (10 % du volume du puits).
- J5 et J8 : Changer le milieu par du R10 frais.
- J11 : Récolter et marquer les cellules de chaque puits séparément pour une analyse par cytométrie en flux selon le protocole décrit dans la partie 2.2. *Marquage intracellulaire* avec les anticorps suivants :
 - Anticorps de surface : CD8 (APC-Cy7, BD Biosciences), CD45RA (PCPCy5.5, eBioscience), CCR7 (PECy7, BD)

- Anticorps intracellulaire : Perforine (FITC, Ozyme), Tbet (eFluor 660, eBioscience), GzmB (V450, BD)

10. Analyses statistiques et packages R/bash utilisés

Les expériences de cytométrie en flux ont été analysées avec GraphPad Prism 9 (version 9.0.0). La significativité a été évaluée avec un test de Mann-Whitney. Les versions suivantes des packages disponibles dans R ont été utilisées : SingleCellExperiment (v1.18.0), scan (v.1.20.1), Seurat (v.4.1.1), pheatmap (v.1.0.12), ggplot2 (v.3.3.6), fgsea (v.1.22.0), mixOmics (v6.20.0) et Immunarch (v0.7.0). Les versions suivantes des packages disponibles dans bash ont été utilisées : MiXCR (v3.0.13), vdjtools (1.2.1), Trimmomatic (v0.39) et STAR (v2.7.0)

Chapitre III :

RÉSULTATS

1. Reconstitution immunitaire des individus de la cohorte IMMUNOCO après des années de traitement

Le suivi des individus de la cohorte est divisé en 3 *time-points* (TP) appelé EARLY (« précoce »), INT (« intermédiaire ») ou LATE (« tardif ») en fonction du temps d'infection depuis le diagnostic. La majorité des individus sont non traités à EARLY, traités par monothérapie peu efficace à INT, et traités efficacement par trithérapie depuis 15 ans en médiane à LATE. L'accès aux données cliniques des individus de la cohorte nous permet de suivre l'évolution de la charge virale entre Janvier 1996 et Octobre 2017 pour 19 des 20 individus de la cohorte. Après introduction de la trithérapie, quelques individus ont continué à présenter des épisodes de réplication virale pendant plusieurs années avant d'établir un contrôle durable jusqu'à LATE (Figure 28A, Annexe 1).

Pour quantifier le contrôle de la virémie nous avons mesuré le temps entre LATE et le dernier épisode majeur de réplication virale (définie arbitrairement comme une charge virale supérieure à 1000 copies/mL). En médiane le dernier épisode de réplication virale majeur est intervenu 11,6 ans en amont de LATE, suggérant un contrôle efficace de la virémie pendant plus d'une décennie (Figure 28B). Il est important de noter que les individus de la cohorte sont hétérogènes au regard du contrôle de la virémie. Grâce au traitement, certains ont maintenu une charge virale indétectable pendant plus de 20 ans (PS228, PS07) tandis que d'autres ont présenté des épisodes de réplication virale récents (PS208, PS01). L'individu PS23 est un cas particulier car celui-ci n'a jamais contrôlé durablement la réplication virale au cours du suivi. Sa virémie a d'ailleurs atteint la valeur maximale (6,58 log copies/mL) mesurée sur l'ensemble du suivi en 2013, à peine 4 ans avant LATE (Annexe 1).

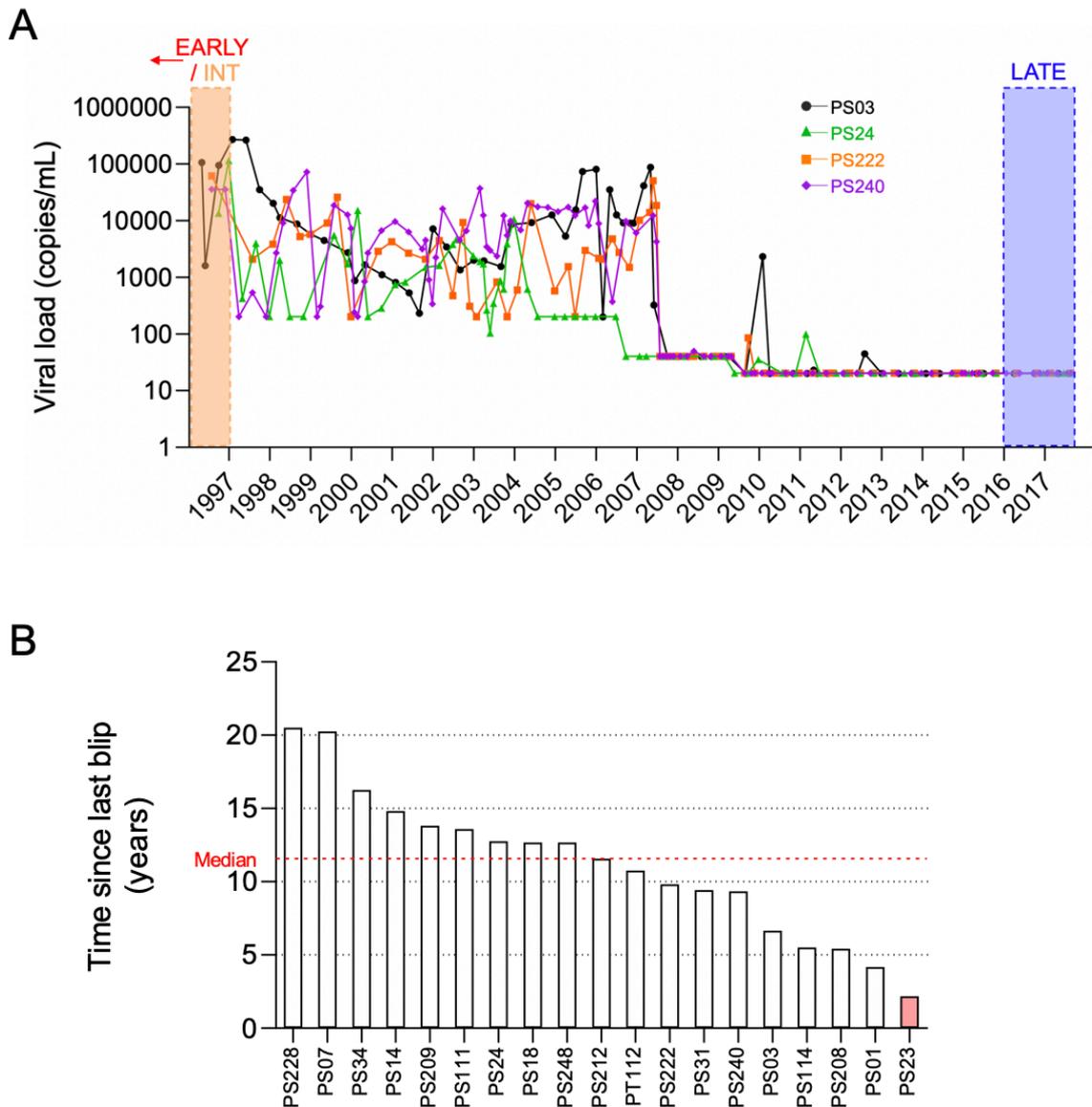


Figure 28 - Évolution de la virémie des patients de la cohorte IMMUNOCO. (A) Évolution de la virémie entre Janvier 1996 et Octobre 2017 de 4 individus représentatifs de la cohorte IMMUNOCO (PS03, PS24, PS222 et PS240). La zone bleue correspond à LATE et la zone jaune à INT. EARLY n'est pas représenté car situé en amont des premières mesures de détection de la charge virale. (B) Nombre d'années entre LATE et le dernier épisode majeur de réplication virale (défini à 1000 copies /mL).

Compte tenu des différences de traitement aux différents points du suivi nous avons cherché à évaluer l'étendue de la reconstitution immune à LATE, après des années de traitement sous trithérapie. Nous observons dans un premier temps une diminution de l'expression de CD38 par les LT CD8 à LATE ($p < 0.0001$) (Figure 29A). CD38 est un marqueur d'activation dont l'expression par les LT CD8 corrèle directement avec la charge virale plasmatique⁴⁴⁵. Une diminution de l'expression de CD38 à LATE est évocatrice d'un

contrôle de la réplication virale après introduction de la trithérapie. Par ailleurs, la réplication virale importante pendant les premières années du suivi à EARLY et INT est marquée par des comptes faibles de LT CD4, bien inférieurs à la limite basse normale de 500 cellules/mm³ (250 et 251 cellules/mm³ respectivement). L'introduction et le maintien de la trithérapie pendant des années permet, en contrôlant durablement la réplication virale, de normaliser significativement le compte CD4 à LATE (780 cellules/mm³, $p < 0.001$). Ce rétablissement des LT CD4 concerne à la fois les cellules CD4 naïves ($p = 0.004$ et $p < 0.001$) mais également les cellules CD4 mémoires ($p < 0.001$ et $p < 0.001$) (Figure 29A). Bien que le compte LT CD4 affichés à LATE soit hétérogène (variant entre 1500 et 390 cellules/mm³), l'intégralité de la cohorte à l'exception de 3 individus maintient un compte LT CD4 supérieur à 500 cellules/mm³. L'un des 3 individus sous la barre des 500 cellules/mm³ est d'ailleurs celui qui n'a jamais contrôlé sa charge virale durablement. On distingue également une normalisation partielle du ratio CD4/CD8 à LATE par comparaison avec EARLY et INT (ratio médian de 0.39, 0.31 et 0.78 pour EARLY, INT et LATE respectivement, $p = 0.02$ & $p < 0.001$) qui ne dépend pas d'une contraction du compartiment LT CD8 car ce dernier reste stable tout au long du suivi (Figure 29B).

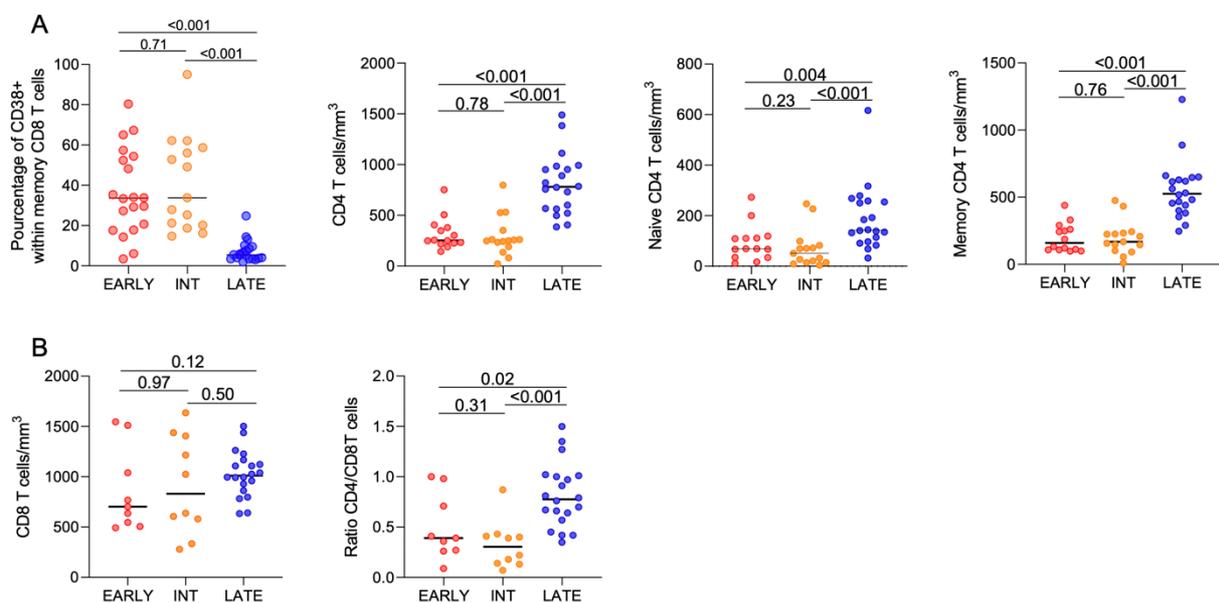


Figure 29 – Diminution de l'activation immunitaire, restauration des LT CD4 et normalisation du ratio CD4:CD8 chez les individus de la cohorte IMMUNOCO. (A) De gauche à droite : Expression de CD38 par les LT CD8 mémoires, compte LT CD4 totaux, compte CD4 naïfs, compte CD4 mémoires. Exprimé en cellules/mm³ de sang. EARLY $n = 14$, INT $n = 15$, LATE $n = 20$. (B) Compte LT CD8 totaux (cellules/mm³ de sang, EARLY $n = 9$, INT $n = 10$, LATE $n = 20$) et ratio CD4:CD8. La significativité a été évaluée avec un test de Mann-Whitney.

En plus d'induire une déplétion majeure des LT CD4, la réplication non contrôlée de VIH-1 altère la composition de la réponse LT CD8 en biaisant la distribution des sous-populations de LT CD8 mémoires vers des populations hautement différenciées définies par l'expression de CD57 et l'absence d'expression de CD28. Ces cellules ont des télomères plus courts, une production d'IL-2 réduite et sont décrites comme approchant de la senescence. Un phénomène similaire a été observé pour les LT CD4 mais d'une manière moins prononcée : l'accumulation de cellules CD28⁻ est moins évidente dans ce compartiment ⁵¹. Plusieurs travaux ont montré que ce phénomène est dépendant de l'activation immunitaire chronique, elle-même associée à la réplication du virus et à d'autres infections persistantes comme CMV. Compte tenu des différences de traitement entre les différents points du suivi, nous avons émis l'hypothèse que le traitement à long terme des individus de la cohorte IMMUNOCO à LATE serait associé à une diminution de la fréquence de cellules hautement différenciées en faveur de cellules exprimant CD28. Nous avons donc mis au point un panel de cytométrie en flux pour caractériser les différentes sous-populations lymphocytaires sur la base de l'expression des marqueurs CCR7, CD45RA, CD28, CD27, CD95 et CD57. Le compartiment mémoire des LT CD8 et LT CD4 a été séparé en 5 sous-populations en fonction de l'expression différentielle de CD28 et CD57. On distingue du moins vers le plus différencié : CM, EM CD28⁺, EM CD28⁻57⁻, EM CD57⁺ et les TEMRA (Figure 30A).

Nous observons une distribution stable des sous-populations mémoires du compartiment LT CD4 au cours du suivi. La seule modification significative est une augmentation du pourcentage de CM à LATE par comparaison avec INT (47,6% et 36,7% en médiane à LATE et INT respectivement. $p = 0.04$) (Figure 30B). En revanche, la distribution des sous-populations de LT CD8 mémoires est largement modifiée. Les premières années du suivi (EARLY et INT) sont caractérisées par une prédominance de EM CD57⁺ et EM CD28⁻/57⁻. Après des années de traitement ces populations sont significativement réduites à LATE qui au contraire montre un enrichissement de cellules effectrices exprimant CD28 (7,6%, 6% et 22,3% à EARLY INT et LATE. $p < 0.0001$) (Figure 30C). Conjointement avec la normalisation du compte LT CD4 et du ratio CD4 :CD8, ces résultats témoignent d'une reconstitution immune efficace chez la plupart des individus de la cohorte IMMUNOCO.

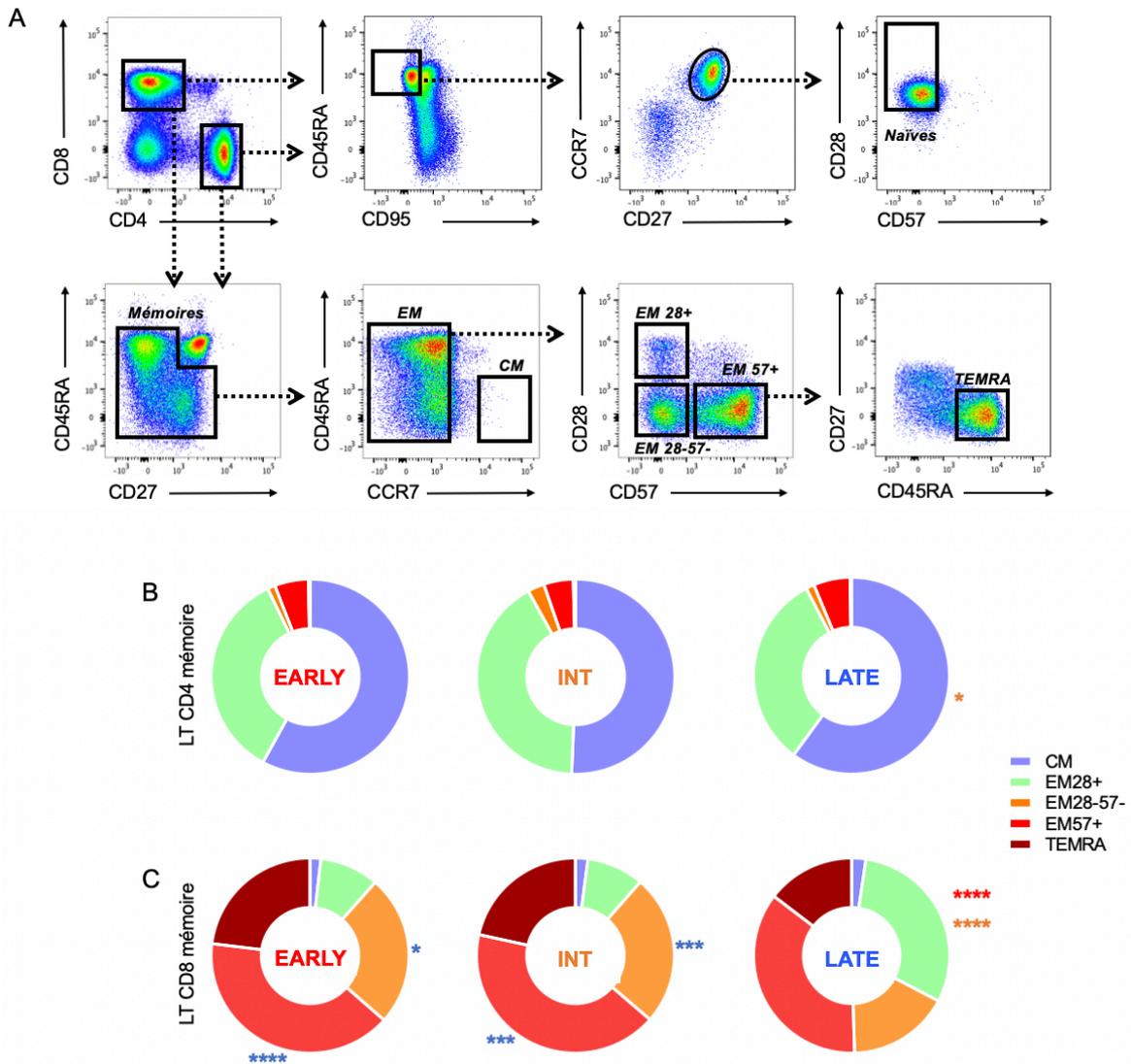


Figure 30 - Caractérisation des sous-populations mémoires des LT CD8 et LT CD4 . (A) Stratégie de gating pour définir les 5 sous-populations mémoires majeures : les CM, EM CD28+, EM CD28-CD57-, EM CD57+ nonTEMRA et les TEMRA. Distribution des sous-populations mémoires de LT CD4 (B) et LT CD8 (C) au sein de la population mémoire totale à EARLY, INT et LATE. La significativité a été évaluée avec un test de Mann-Whitney (* $p < 0.05$, * $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). * = significatif par rapport à EARLY, * = significatif par rapport à INT, * = significatif par rapport à LATE**

2. Vieillesse immunitaire des individus de la cohorte IMMUNOCO

La reconstitution immunitaire efficace chez les individus de la cohorte IMMUNOCO est une observation encourageante et atteste de la capacité du traitement à contrôler la charge virale de manière durable. Toutefois, il est important de prendre en compte le vieillissement naturel de ces individus. En effet, la durée exceptionnellement longue du suivi de la cohorte IMMUNOCO est accompagnée d'un vieillissement significatif. L'âge médian à LATE est de 61,5 ans et 3 individus ont plus de 74 ans (74, 78 et 78 ans pour PS111 et PS228 et PS24 respectivement) (Figure 31A). En conséquence, nous avons cherché à évaluer l'impact du vieillissement sur différents paramètres immunologiques dont l'évolution avec l'âge est connue. La fréquence de cellules naïves est par exemple un très bon indicateur de « l'âge immunologique »⁵¹. Nous observons à LATE une diminution significative de la proportion de LT CD4 naïfs ($p = 0.01$) (Figure 31B). Pour éviter un biais potentiel induit par la réplication massive virale et la déplétion des LT CD4 pendant les premières années du suivi, nous avons également évalué la fréquence des LT CD8 naïfs. D'une manière générale les LT CD8 sont plus sensibles aux altérations immunitaires induites par l'âge et constituent un meilleur marqueur du vieillissement. Nous observons que la fréquence et le nombre absolu de LT CD8 naïfs sont également diminués à LATE ($p = 0.05$) (Figure 4C). D'une manière notable, la proportion et le compte de LT CD8 naïfs à LATE sont similaires à ceux observés chez des individus séropositifs (OLD HIV) ou séronégatifs (OLD HD) plus âgés (supérieurs à 75 et 65 ans respectivement) (Figures 31C&D).

Pour confirmer nos observations nous avons cherché à mesurer la taille des télomères, un autre paramètre associé au vieillissement. Les télomères s'érodent progressivement après chaque division cellulaire et l'âge est associé à une accumulation de cellules avec des télomères courts, incapables de proliférer. Cet aspect de la biologie du vieillissement est d'autant plus pertinent que l'infection à VIH-1 est capable d'accélérer ce processus⁴⁴⁶. Nous avons donc mesuré l'impact du vieillissement sur la taille des télomères de plusieurs sous-populations immunitaires incluant les progéniteurs hématopoïétiques (HPC), les LT CD4 et CD8 naïfs ainsi que les LT CD8 mémoires CD57+ (M57+). Les HPC dérivent des cellules souches hématopoïétiques et sont un stade précoce du développement lymphocytaire. Ces cellules représentent donc les ressources immunitaires primaires et sont caractérisées par des télomères plus grands que ceux des lymphocytes matures dans la périphérie⁴³⁵. A l'inverse les M57+ sont des cellules hautement différenciées avec des télomères courts approchant de la

senescence répliquative ⁴⁴⁷. Conjointement ces deux types cellulaires nous offrent une comparaison pour évaluer la taille des télomères des LT CD8 et CD4 naïfs. Conformément à nos attentes, les adultes sains (AS) inclus comme contrôle (âge médian à 32 ans) (Figure 31E, vert) montrent des LT CD8 naïfs avec des télomères plus grands que leur équivalent chez les individus de la cohorte IMMUNOCO. De la même manière nous observons que les M57+ ont des télomères plus courts que leurs LT CD8 naïfs associés, aussi bien pour les AS ($p = 0.004$) que pour les individus IMMUNOCO ($p = 0.002$, $p = 0.008$ et $p = 0.05$ à EARLY, INT et LATE respectivement) (Figure 31E). En revanche, au fur et à mesure du suivi, les télomères des LT CD8 naïfs des individus IMMUNOCO approchent les M57+ au regard de la taille (8.03, 7.79 et 7.82 kb en médiane à EARLY, INT et LATE respectivement). Bien que non significatif, il semble exister une tendance à la diminution de la taille des télomères des LT CD8 naïfs avec les années (Figure 31E). Par ailleurs, les HPC et les LT CD4 naïfs des individus IMMUNOCO montrent eux aussi des télomères considérablement réduits (Figure 31F).

Conjointement, la fréquence diminuée des compartiments LT CD4 et CD8 naïfs ainsi que la diminution de la taille des télomères est évocatrice d'un vieillissement immunitaire significatif des individus de la cohorte IMMUNOCO.

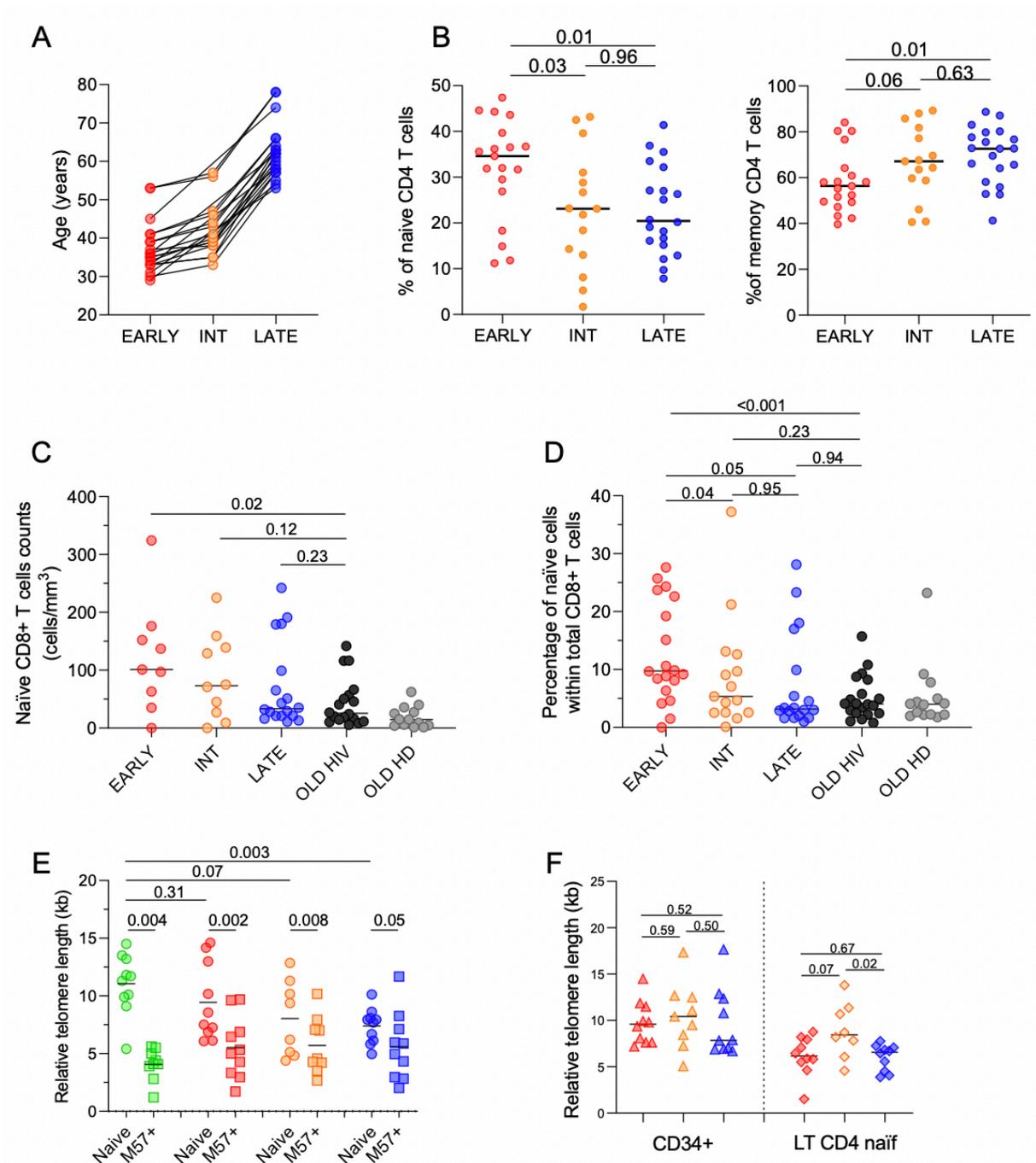


Figure 31 – Vieillesse immunitaire des individus de la cohorte IMMUNOCO. (A) Vieillesse des individus de la cohorte IMMUNOCO (B) Proportion de cellules naïves (gauche) et mémoires (droite) au sein des LT CD4 totaux. EARLY $n = 19$, INT $n = 15$, LATE $n = 20$ (C) Comptes et (D) pourcentage de LT CD8 naïfs des individus IMMUNOCO comparé à des individus séropositifs plus âgés (OLD HIV, > 75 ans) ou séronégatifs plus âgés (OLD HD, >65 ans). La significativité a été évaluée avec un test de Mann-Whitney. (C- EARLY $n = 19$, INT $n = 15$, LATE $n = 20$, OLD HIV $n = 18$, OLD HD $n = 13$; D - EARLY $n = 9$, INT $n = 10$, LATE $n = 20$, OLD HIV $n = 18$, OLD HD $n = 13$) (E) Comparaison de la taille des télomères de LT CD8 naïfs et LT CD8 mémoires CD57+ entre des adultes sains (AS, vert) et les individus de la cohorte IMMUNOCO à EARLY (rouge), INT (orange) et LATE (bleu). JAS $n = 9$, EARLY $n = 10$, INT $n = 10$, LATE $n = 10$. (F) Taille des télomères des progéniteurs hématopoïétiques (CD34+) et des LT CD4 naïfs des individus IMMUNOCO à EARLY, INT et LATE ($n = 10$).

3. Caractérisation phénotypique de la réponse LT CD8 spécifiques du virus

Au vu du vieillissement significatif du compartiment immunitaire des individus de la cohorte IMMUNOCO, nous avons cherché à évaluer l'état de la réponse LT CD8 spécifique du virus après 25 ans d'évolution naturelle et sous traitement de l'infection. Pour y parvenir nous disposons de tétramères permettant de détecter les réponses LT CD8 spécifiques de 9 épitopes viraux répartis sur les protéines virales Gag, Nef et Env. La séquence et la protéine d'origine des épitopes étudiés sont indiquées dans le tableau 2 (Matériel et Méthodes). Sur l'ensemble de la cohorte, 11 individus présentaient un HLA compatible avec l'utilisation de nos tétramères. Le marquage des PBMCs des individus de la cohorte avec les tétramères a permis de détecter 13 réponses distinctes réparties sur 8 individus (Annexe 2). Un exemple représentatif d'une réponse LT CD8 spécifique de EI8 est montré Figure 32A.

Nous observons une diminution de la fréquence de LT CD8 tétramères + à LATE par comparaison avec EARLY (0.05 % vs 0.008 % des LT CD8 totaux en médiane, $p = 0.05$) (Figure 32B). Cette observation est en accord avec la littérature qui suggère des réponses réduites mais toujours détectables *ex vivo* même après des années de traitement^{393,394}. Le rôle protecteur des HLA-I est largement décrit dans le contexte de l'infection à VIH-1. Certains HLA-I sont associés à une progression plus lente de la maladie (B*57) et d'autres, au contraire, favorisent la progression (B*35). Nous avons donc cherché à évaluer l'impact du HLA sur la fréquence et le maintien d'une réponse LT CD8 spécifique du virus au cours du temps. D'une manière intéressante la fréquence des réponses spécifiques du virus est plus importante lorsque restreinte par un HLA-B, indépendamment du TP considéré. Les réponses restreintes par B*07 font exception puisqu'une seule réponse de faible magnitude a été détectée à EARLY sur l'ensemble de la cohorte (Figure 32C gauche). Lorsque les réponses sont stratifiées en fonction du suivi, il est possible d'observer que EARLY et INT présentent des réponses restreintes par la majorité des HLA présents dans la cohorte, sans qu'aucun enrichissement de HLA ne soit évident. A l'inverse, la majorité des réponses toujours détectables à LATE sont restreintes par les HLA-B*57 et B*08 (Figure 32C droite). En l'état il n'est pas clair si ces observations sont biaisées par le choix des épitopes associés à chaque HLA ou s'il existe bel et bien une capacité supérieure des HLA-B*57 et B*08 à maintenir une réponse LT CD8 spécifique du virus au cours du temps.

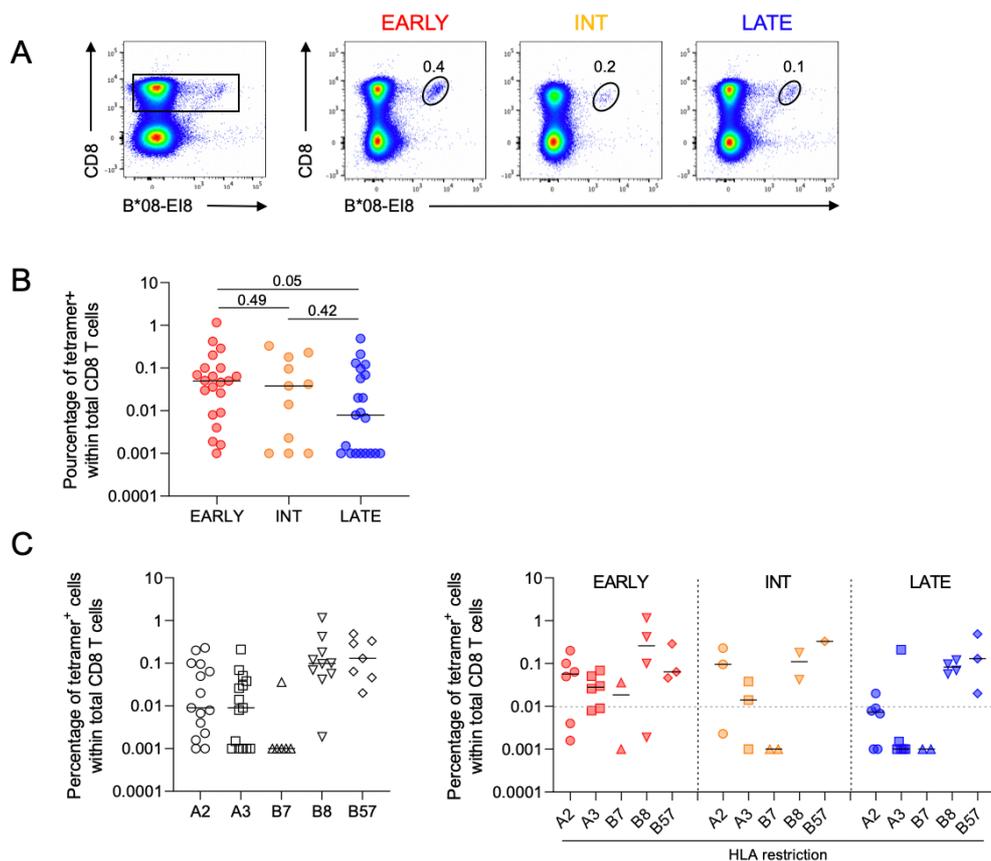


Figure 32 – Fréquence des réponses LT CD8 spécifiques du virus au cours du temps. (A) Marquage représentatif d'une réponse tétramère + à EARLY, INT et LATE (réponse B*08-EI8 de PS24). (B) Fréquence des réponses LT CD8 spécifiques du virus au sein de la population LT CD8 totale. EARLY $n = 21$, INT $n = 11$ and LATE $n = 21$. (C) Impact du HLA sur la fréquence des réponses LT CD8 spécifiques du virus indépendamment du TP (gauche) et stratifié en fonction du TP (droite). Les pointillés représentent la limite de détection des populations tétramères +. Chaque point représente une population LT CD8 tétramère+ distincte. La barre indique la médiane. La significativité a été évaluée avec un test de Mann-Whitney.

Nous avons ensuite appliqué le panel de cytométrie utilisé précédemment sur les LT CD8 et CD4 mémoires pour caractériser l'état de différenciation, d'activation et de sénescence des LT CD8 spécifiques du virus après des années de traitement (Figures 30A et 33A). Les LT CD8 spécifiques du virus montrent une expression réduite de CD38 à LATE par comparaison avec EARLY et INT ($p = 0.02$ et $p = 0.01$). De la même manière que pour les LT CD8 mémoires totaux, cette observation souligne la capacité du traitement à limiter l'activation immunitaire chronique en contrôlant la réplication charge virale. Les marqueurs de différenciation CCR7 et CD45RA sont faiblement exprimés indépendamment du TP, suggérant que les LT CD8 spécifiques du virus maintiennent un profil effecteur mémoire tout au long du suivi. L'expression de CD27 possède une cinétique particulière par comparaison avec les autres marqueurs de différenciation. La majorité des LT CD8 spécifiques du virus

sont CD27+ à EARLY avant d'en perdre l'expression quelques années plus tard à INT ($p = 0.01$). Après des années de traitement efficace, l'expression de CD27 à LATE retourne à son niveau initial au début du suivi ($p = 0.06$) (Figure 33C). De manière surprenante, nous observons que les LT CD8 spécifiques du virus ont une expression réduite de CD57 ($p = 0.11$ et $p = 0.03$) et une expression accrue de CD28 ($p = 0.03$ et $p = 0.04$) à LATE, suggérant que ces cellules sont moins sénescentes et moins différenciées après des années de traitement (Figure 33B). L'expression accrue de CD28 rappelle une caractéristique des LT CD8 spécifiques de VIH-2 qui présentent des propriétés antivirales robustes tout en maintenant un profil peu différencié⁴⁴⁸⁻⁴⁵⁰. Ces données phénotypiques laissent suggérer qu'après des années de traitement les LT CD8 spécifiques du virus, au lieu de présenter un profil de plus en plus sénescent et différencié, ont au contraire préservé un certain potentiel de jeunesse, malgré un vieillissement marqué du compartiment immunitaire.

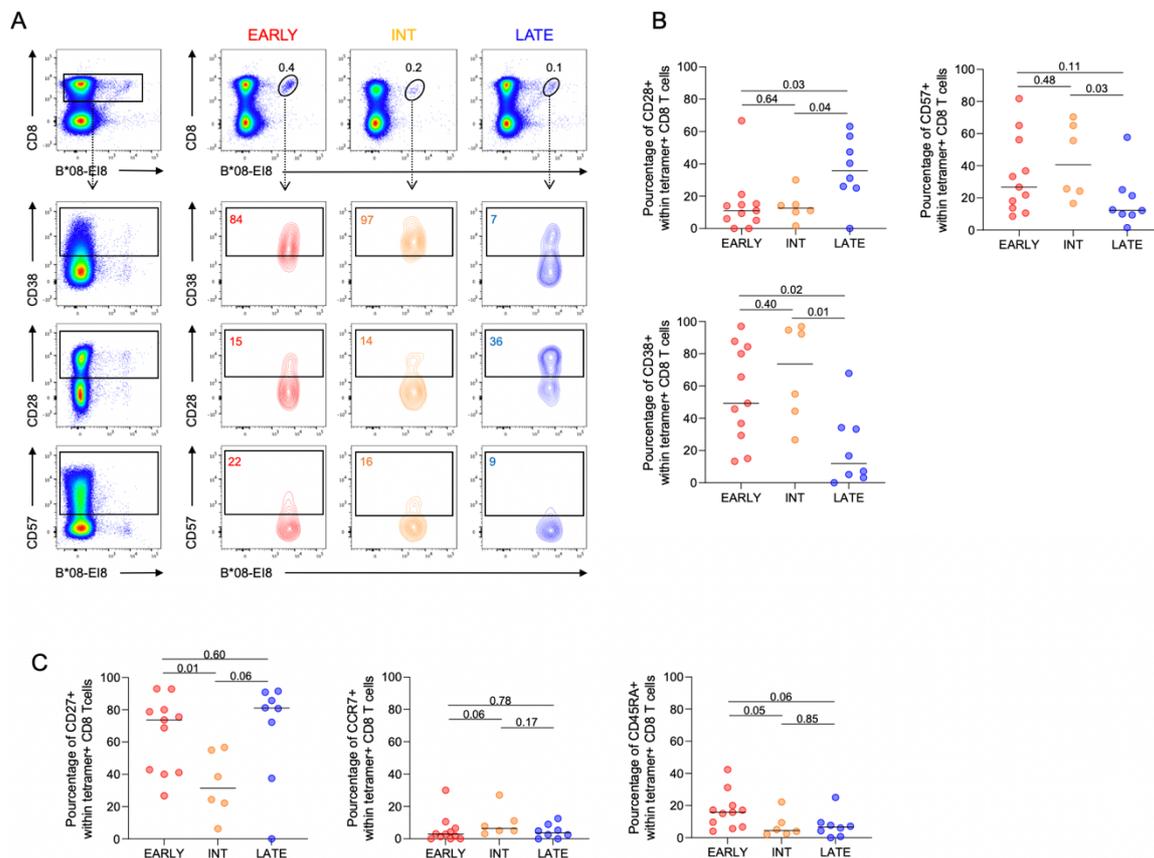


Figure 33 – Caractérisation phénotypique des LT CD8 spécifiques du VIH-1 au cours du temps. (A) Stratégie de gating pour évaluer l'expression de CD38, CD28 et CD57 sur une réponse tétramère +. (B) Expression de CD28, CD38 et CD57 par les LT CD8 tétramères +. (C) Expression de CD27, CCR7 et CD45RA par les LT CD8 tétramères +. EARLY $n = 11$, INT $n = 6$, LATE $n = 8$. Chaque point représente une population LT CD8 tétramère+ distincte. La barre indique la médiane. La significativité a été évaluée avec un test de Mann-Whitney.

4. Caractérisation transcriptomique de la réponse LT CD8 spécifiques du virus

Notre objectif suivant fut de caractériser les LT CD8 spécifiques du VIH à un degré supérieur que ne permet pas l'étude du phénotype par cytométrie en flux. Toutefois, la taille des populations LT CD8 tétramères + est un inconvénient majeur. Bien que ces populations soient hétérogènes en termes de taille, peu d'entre elles dépassent les 0,1 % des LT CD8 totaux à LATE. A titre d'exemple, la population tétramère + la plus importante détectée au sein de la cohorte IMMUNOCO, celle spécifique de FL8 chez PS24, composée de 940 cellules (dans 10^7 PBMCs) à EARLY, n'est composée que de 106 cellules (dans 10^7 PBMCs) à LATE (Annexe 3). Il est donc impossible de procéder à une caractérisation fonctionnelle de ces cellules. En revanche, certaines technologies de scRNAseq offrent la possibilité de caractériser le transcriptome de populations rares comme les nôtres. Nous nous sommes donc tournés vers la technologie SMARTseq, qui à l'inverse des technologies de scRNAseq courantes (10X notamment), ne nécessite pas une quantité initiale importante de cellules.

Nous avons tout d'abord sélectionné parmi la cohorte les individus les plus pertinents pour le scRNAseq en fonction de la fréquence des réponses LT CD8 tétramères à chaque TP et de la disponibilité en échantillon. Quatre individus ont ainsi été sélectionnés pour séquencer 5 réponses LT CD8 spécifiques de différents épitopes : A*02-SL9 pour PS212, A*03-QK10 de PS14, B*08-EI8 et B*08-FL8 de PS24 et B*57-KF11 de PS03 (Annexe 3). Nous avons également inclus les échantillons de deux individus contrôleurs infectés par VIH-2 (JFFT et XQXH) en tant que contrôle d'une réponse efficace face à une infection rétrovirale (réponse B*53-TL9). Pour chaque réponse à chaque TP nous avons trié et séquencé entre 50 et 95 cellules. L'objectif de l'expérience de scRNAseq est double : d'une part caractériser l'évolution du transcriptome des réponses LT CD8 spécifiques du virus au cours du temps, et d'autre part, séquencer le TCR sur les régions CDR3 des chaînes α et β pour glaner des informations sur l'évolution clonotypique en parallèle du transcriptome (Figure 34).

Malheureusement, l'étude d'échantillons historiques vieux de 30 ans vient avec un prix : celui de la qualité. Une grande partie des cellules séquencées n'ont pas passé l'étape du contrôle qualité après séquençage. De plus, le marquage tétramère des échantillons de PS14 s'est avéré largement non-spécifique pour les réponses à EARLY et INT (Annexe 3). Sur la totalité des 1508 cellules initialement triées et séquencées, seules 508 ont pu être analysées.

En conséquence, une analyse complète du transcriptome a pu être réalisée uniquement pour les réponses B*08-EI8 et B*08-FL8 de PS24 et B*57-KF11 de PS03.

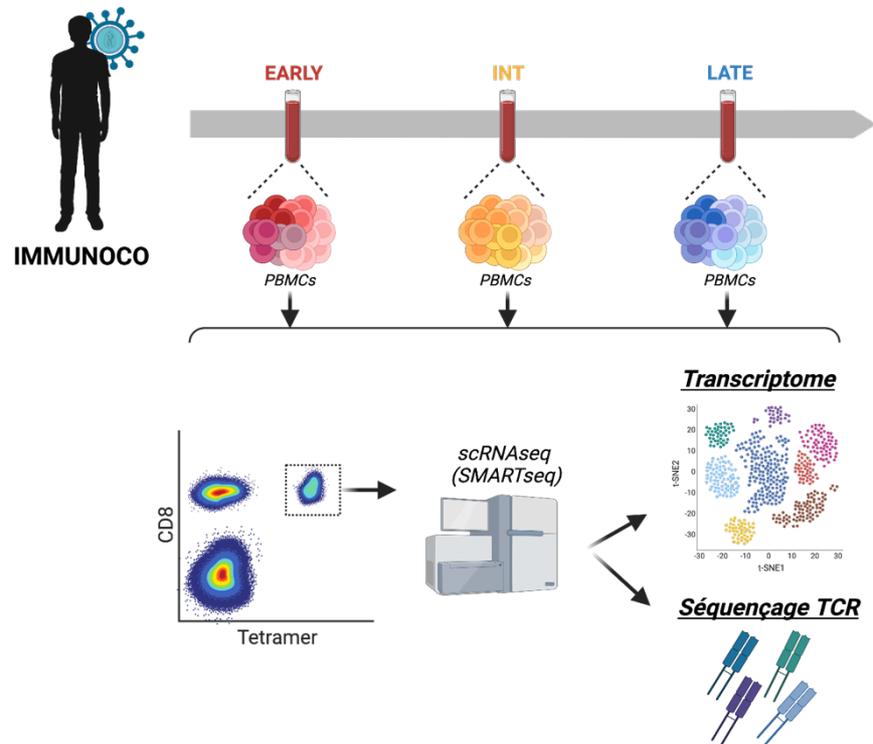


Figure 34 - Représentation schématique de la stratégie du scRNAseq

4.1 Les réponses LT CD8 spécifiques du virus à EARLY et LATE ont des transcriptomes distincts.

Les réponses B*08-EI8, B*08-FL8 et B*57-KF11 proviennent de deux individus distincts, sont restreintes par des HLA différents et ne contiennent pas le même nombre de cellules chacune. Pour éviter un biais associé à l'un de ces paramètres, l'analyse transcriptomique a été réalisée séparément pour PS24 et PS03. Une analyse en composante principale (PCA) révèle des groupes de cellules avec des transcriptomes distincts correspondant aux TP EARLY et LATE, aussi bien pour PS03 que pour PS24 (Figure 35A). La différence est particulièrement marquée pour PS03 où la séparation des cellules EARLY et LATE intervient sur la première composante principale (PC1) expliquant 7 % de la variance. La séparation de EARLY et LATE chez PS24 intervient sur la PC2 expliquant 2 % de la variance. La dimension des données a ensuite été réduite en sélectionnant les 8 premières composantes principales pour retenir le maximum de signal biologique tout en filtrant le bruit indésirable

qui caractérise les données de scRNAseq. Après réduction de la dimension, une visualisation des données par Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) permet de discriminer les LT CD8 de EARLY et LATE pour les deux individus (Figures 35B&C). On observe pour PS24 que la discrimination entre EARLY et LATE s'opère indépendamment de la spécificité pour E18 ou FL8, suggérant que les deux groupes de cellules ont un transcriptome relativement similaire (Figure 35B droite). En conséquence, les deux groupes de cellules sont fusionnés pour le restant des analyses. Conjointement ces résultats indiquent que les transcriptomes des LT CD8 spécifiques du virus diffèrent entre EARLY et LATE.

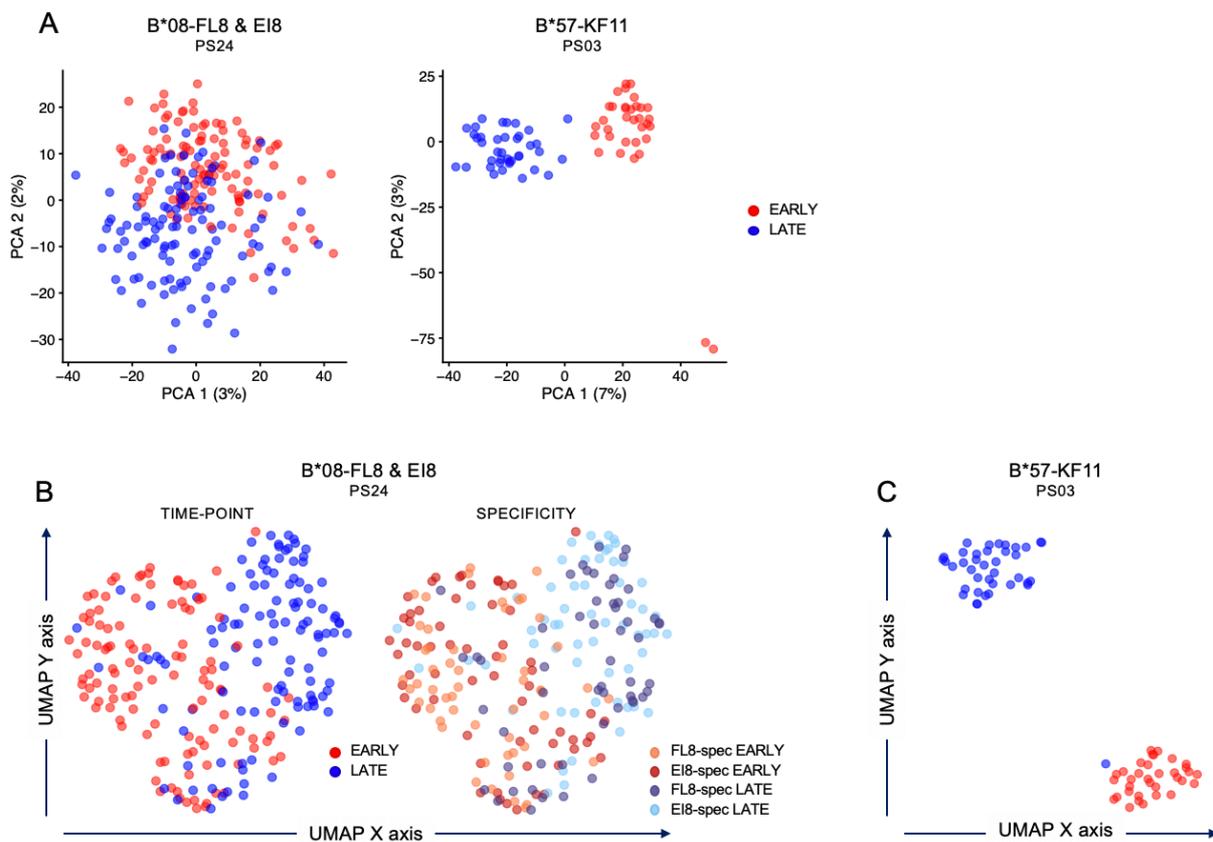


Figure 35 – PCA et visualisation de la distribution du transcriptome des LT CD8 spécifiques du virus pour PS24 et PS03. (A) PCA du transcriptome des réponses B*08-E18 et B*08-FL8 de PS24 et de la réponse B*57-KF11 de PS03, colorées en fonction du TP. (B) UMAP des réponses B*08-E18 et B*08-FL8 de PS24 colorées en fonction du TP (gauche) ou de la spécificité (droite). (C) UMAP de la réponse B*57-KF11 de PS03 coloré en fonction du TP.

4.2 Les profils transcriptomiques des réponses EARLY et LATE sont respectivement associés à l'épuisement et à la stemness

L'analyse des gènes différentiellement exprimés (DEG) révèle 362 et 372 gènes différentiellement exprimés entre EARLY et LATE pour PS24 et PS03 respectivement. Au sein de ces gènes, l'estimation du log Fold Change (logFC) permet d'identifier ceux fortement associés à EARLY (défini par un log FC inférieur à -1) et à LATE (défini par un log FC supérieur à 1) (Figures 36A&B).

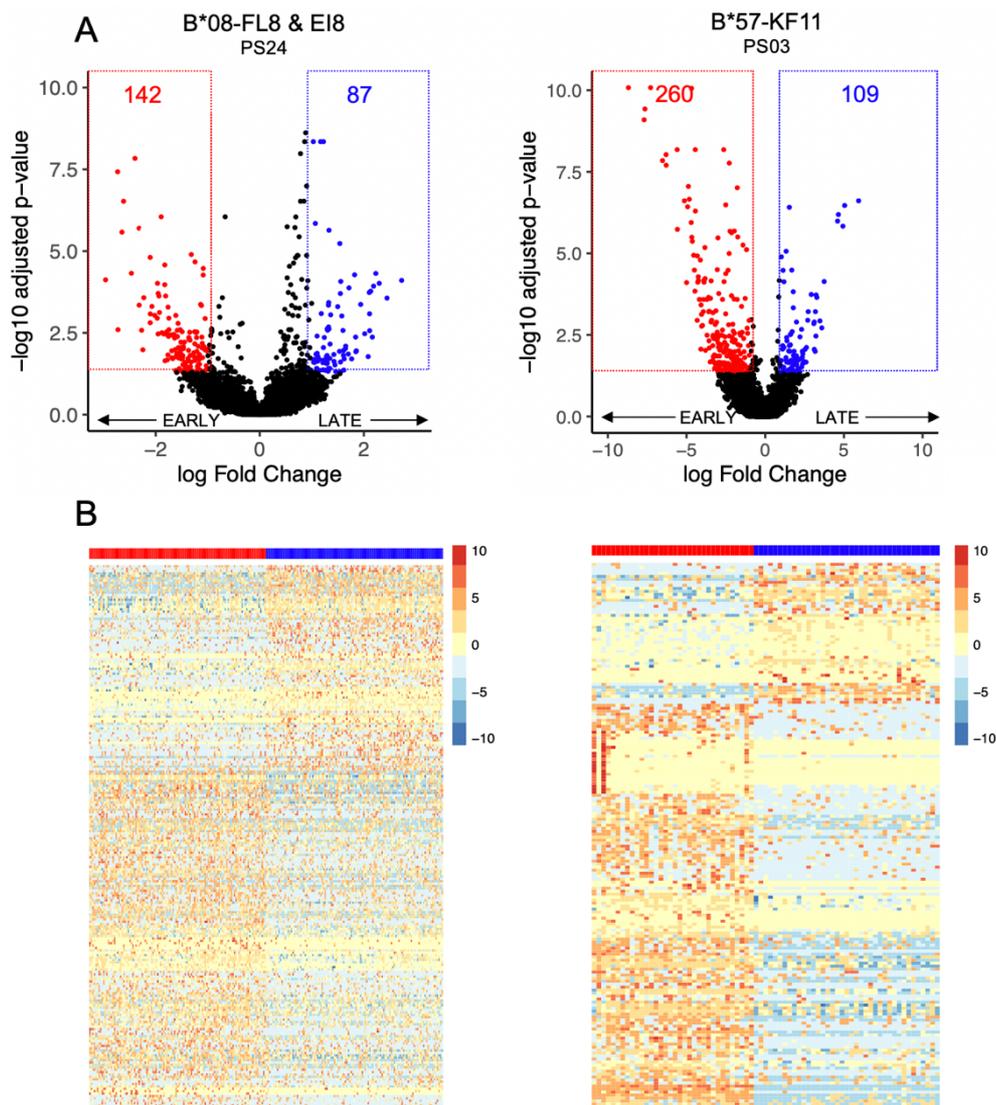


Figure 36 - Volcano plot des gènes différentiellement exprimés entre EARLY et LATE pour PS24 et PS03. (A) Volcano plot des DEG entre EARLY et LATE. L'axe x représente le log FoldChange (log FC) et l'axe y représente la significativité après correction par le FDR (False Discovery Rate). Les gènes avec un log FC < -1 (fortement exprimé à EARLY) sont encadrés en rouge, les gènes avec un log FC > 1 (fortement exprimé à LATE) sont encadrés en bleu. (B) Heatmap des gènes fortement exprimés à EARLY et LATE pour PS24 (gauche) et PS03 (droite).

Par souci de clarté et pour éviter une forme de redondance, les figures suivantes se concentrent sur PS24. Des figures similaires pour l'analyse de la réponse B*57-KF11 de PS03 sont présentées dans l'annexe 4. Parmi les gènes qui caractérisent les réponses B*08-FL8 et B*08-EI8 à EARLY figurent *Ly6e*, *Cemip2*, *Ifi44l*, *Ifi6*, *Riok3* ou encore *Ifitm1* suggérant l'existence d'une signature interféron (IFN). Ces cellules sont également caractérisées par l'expression de récepteurs d'inhibition (*Prdm1*, *Adgrg1*), de gènes associés à l'inhibition de la réponse LT CD8 (*Peli1*, *Sla2*, *B3gnt2*) et du facteur de transcription *Tox* dont l'expression a été associée avec l'épuisement des LT CD8. A l'inverse la majorité des gènes exprimés à LATE sont des marqueurs de différenciation précoce associés avec l'autorenouvellement et la survie (« stemness ») : *Il7r*, *Cxcr4*, *Gzmk*, *Ccr7*, *Sell*, *Bcl6*, *Klf2* (Figure 37). Ces observations ont été confirmées chez PS03 pour qui la réponse B*57-KF11 à EARLY est également caractérisée par l'expression de gènes associés à la réponse IFN (*Ifi27*, *Ifi44l*, *Ifi6*, *Isg15*) et aux récepteurs d'inhibition (*Prdm1*, *Havcr2*) tandis que la même réponse à LATE exprime des gènes additionnels associés à un profil de différenciation précoce et à la stemness (*Tcf7*, *Il7r*, *Nell2*) (Annexe 4).

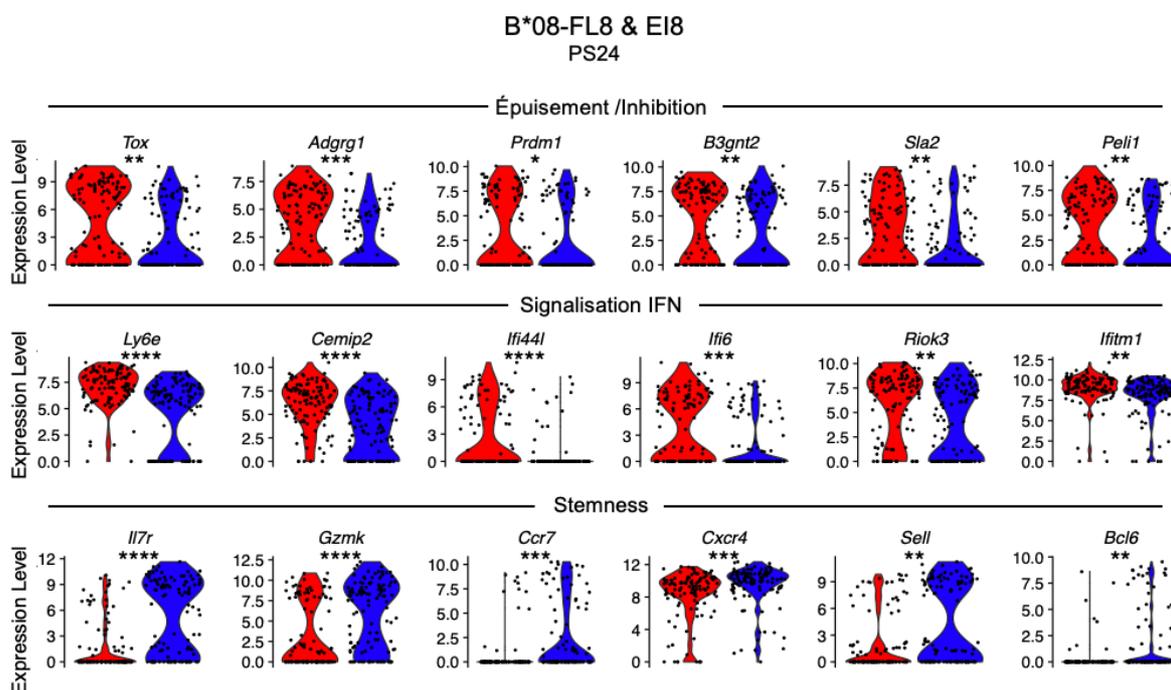


Figure 37 – Violins-plots de gènes clés différentiellement exprimés entre EARLY et LATE pour PS24. Violins-plots de gènes associés à l'épuisement et à l'inhibition (haut), signalisation IFN (milieu) et stemness (bas) des LT CD8. Les violins-plots représente la courbe de densité de probabilité des différentes valeurs. Les violins-plots en rouge et bleu correspondent à EARLY et LATE respectivement. Chaque point représente une cellule. La significativité a été évaluée par un test de Wilcoxon non appariée. La p-value après correction FDR est indiquée (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$).

Pour valider nos résultats nous avons appliqué l'algorithme GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) sur les bases de données de Réactome (2601 voies de signalisation) et Hallmarks (50 voies de signalisation) pour identifier les voies de signalisations biologiques associées à EARLY ou à LATE. En cumulé, les bases de données de Réactome et Hallmarks nous permettent de comparer les transcriptomes de nos échantillons à plus de 2650 voies de signalisations distinctes. Nous avons également inclus des voies de signalisation créées manuellement contenant les signatures géniques de LT CD8 CM ou EM notamment. Nous observons 50 et 38 voies de signalisations associées à EARLY et LATE respectivement pour PS24 (FDR < 0.20). Les plus significatives sont représentées dans la Figure 38A. D'une manière importante l'analyse GSEA permet de valider nos précédentes observations en montrant que les LT CD8 à EARLY sont caractérisés par une signature IFN et l'expression de molécules co-inhibitrices. On distingue également que les voies de signalisation de l'apoptose et de la stabilisation de p53 sont associées à EARLY, suggérant une susceptibilité supérieure à l'apoptose et à la mort cellulaire dans les premières années du suivi. Enfin, la signature transcriptomique à EARLY est similaire à celle de LT CD8 exprimant le marqueur de différenciation terminale KLRG1 (Figure 38B). Ces résultats argumentent en faveur d'un profil effecteur associé à l'épuisement des LT CD8 spécifiques du VIH à EARLY. Ces signatures sont absentes des cellules à LATE qui au contraire montrent un transcriptome de cellules moins différenciées : leur signature est proche de celle de LT CD8 CM. On retrouve également à LATE des voies de signalisations associées à la traduction et à la machinerie protéique (*Translation initiation, rRNA Processing*) (Figure 38C). La comparaison EARLY et LATE pour la réponse B*57-KF11 de PS03 génère des résultats similaires. On observe que les voies de signalisation associées à la réponse IFN, l'apoptose, la stabilisation de p53 et l'expression de molécules co-inhibitrices sont enrichies à EARLY tandis que LATE est caractérisé par une signature proche des LT CD8 CM. Il est important de préciser qu'on ne distingue pas de signature associée à la traduction et à la machinerie protéique chez PS03 à LATE. Cette caractéristique semble spécifique aux réponses B*08-EI8 et FL8 de PS24 (Annexe 4).

Ainsi l'analyse transcriptomique des réponses LT CD8 à EARLY et LATE révèle deux profils différents : l'un marqué par l'expression de récepteur d'inhibition et un profil LT CD8 effecteur associé à l'épuisement, et l'autre associé à un profil de différenciation mémoire précoce et à la stemness des LT CD8 malgré un vieillissement significatif du compartiment immunitaire.

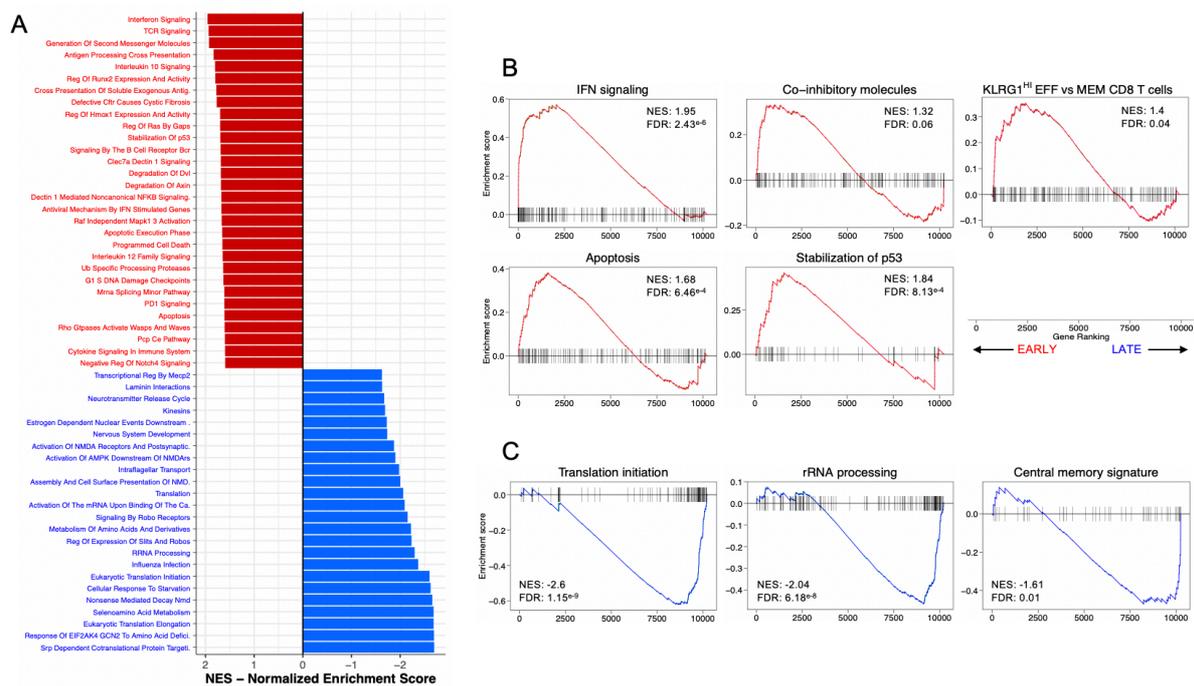


Figure 38 - Voies de signalisation associées à EARLY et LATE identifiées par GSEA. (A) Top 54 voies de signalisation issues des bases de données Réactome et Hallmarks associées à EARLY (rouge) ou LATE (bleu). L'axe x représente le score d'enrichissement normalisé (NES). Seuil de détection : FDR < 0.2 et NES > 1.5. (B) Enrichissement à EARLY des voies de la signalisation IFN, de l'expression de molécules inhibitrices, de l'apoptose, de la stabilisation de p53 et d'une signature effectrice. (C) Enrichissement à LATE des voies de signalisation associées à la machinerie protéique et la traduction ainsi qu'à la signature Centrale Mémoire.

4.3 Les réponses LT CD8 spécifiques à LATE ont une signature transcriptomique proche de celle trouvée chez les contrôleurs

Nous avons ensuite cherché à comparer les signatures détectées à EARLY et LATE avec celles de progresseurs et d'EC VIH-1 déjà publiées. Pour y parvenir l'étude de Quigley *et al* est particulièrement pertinente : les auteurs ont comparé le transcriptome de LT CD8 spécifique de Gag entre 19 individus progresseurs non traités et 24 EC. Dans cette étude les auteurs montrent une différence significative du transcriptome entre les deux groupes. En effet, les progresseurs sont caractérisés par une expression accrue de gènes liés à la réponse IFN et à l'expression de molécules du CMH-I (cohérent avec une charge virale élevée chez ces individus) tandis que les EC montrent une expression accrue de gènes liés à la machinerie protéique et à la traduction ⁴⁵¹. Conformément à nos attentes, le transcriptome des LT CD8 à EARLY est remarquablement similaire à celui d'individus progresseurs non traités (PS24 : NES = 1.77 & p = 7.6^{e-4} – PS03 : NES = 2.2 & p = 3.5^{e-9}). La majorité des gènes impliqués dans cette signature sont associés aux récepteurs d'inhibition (*Adgrg1*, *Prdm1*) ou impliqués dans la réponse à l'IFN (*Ifi44l*, *Oas3*) (Figure 39A). A l'inverse, les réponses B*08-EI8 et B*08-FL8 de PS24 et B*57-KF11 de PS03 à LATE montrent un transcriptome dont la signature est proche de celle d'EC (PS24 : NES = -1.77 & p = 0.04) (Figure 39B). Cette observation est due à l'expression partagée de gènes associés à la stemness (*Ccr7*, *Cxcr3*, *Nell2*) et à la traduction (*Rps16*).

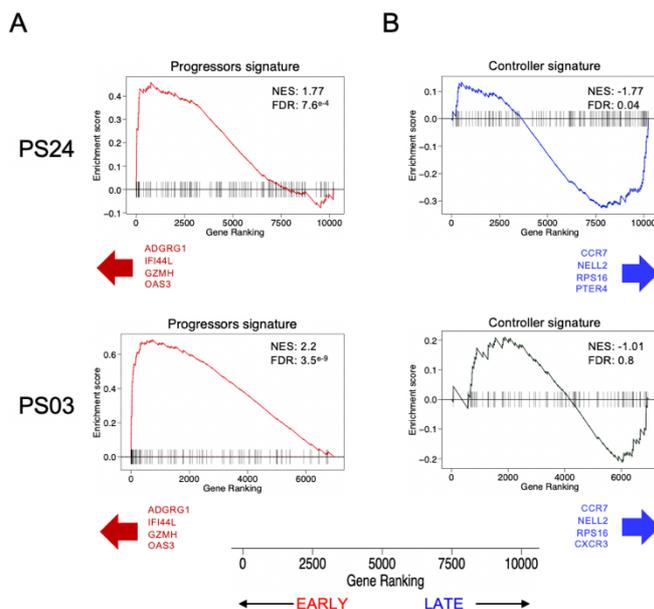


Figure 39 - Comparaison du transcriptome des LT CD8 à EARLY et LATE avec la signature d'individus progresseurs et d'EC. Comparaison des signatures de EARLY et LATE avec celles d'individus progresseurs (A) ou d'EC (B) VIH-1 défini par Quigley et al.

Nous avons également cherché à comparer nos signatures avec celles d'individus contrôleurs infectés par VIH-2, qui offrent un autre paradigme de contrôle efficace de l'infection. Les individus infectés par VIH-2 sont caractérisés par une réponse LT CD8 spécifiques du virus avec de fortes fonctions effectrices et une expression accrue de CD28 par comparaison avec leur équivalent chez les individus infectés par VIH-1. Nous avons donc comparé le transcriptome de PS03 et PS24 avec ceux des deux individus VIH-2 que nous avons séquencés.

Une analyse par PCA révèle trois groupes correspondants aux cellules EARLY, LATE et VIH-2 aussi bien pour PS03 que pour PS24. Il est possible d'observer que les LT CD8 de LATE se rapprochent des cellules VIH-2 et de celles exprimant CD28 (Figure 40A droite). A la vue de la comparaison avec le transcriptome des EC nous supposons que les cellules LATE de PS24 se regrouperaient dans la proximité immédiate des cellules VIH-2. Pourtant d'une manière surprenante cette distinction est plus marquée pour la réponse B*57-KF11 de PS03 à LATE. En se concentrant sur PS03, la caractérisation des gènes associés à EARLY, LATE et VIH-2 nous a permis de mettre en évidence 532 gènes (FDR < 0.001) associés aux 3 groupes. D'une manière notable, les LT CD8 à LATE partagent avec les LT CD8 spécifiques du VIH-2 l'expression de gènes associés à la différenciation précoce et la stemness (*Tcf7*, *Nell2*, *GzmK*, *Il7r*) tout en montrant une expression réduite des gènes associés aux fonctions effectrices (*GzmB*, *GzmH*, *Prfl*) et à l'épuisement (*Prdm1*, *Adgrg1*) qui caractérisent les LT CD8 à EARLY (Figure 40B).

Conjointement, ces résultats suggèrent que les LT CD8 à LATE partagent une signature transcriptomique avec les LT CD8 d'individus contrôleurs infectés par VIH-2 associée à la stemness de la réponse LT CD8. L'association des données phénotypiques et transcriptomiques montrent que les individus ayant présenté une réponse LT CD8 spécifiques du virus épuisée dans les premières années du suivi ont été en mesure de rétablir une réponse LT CD8 avec des caractéristiques associées à la stemness et un potentiel fonctionnel après des années de traitement.

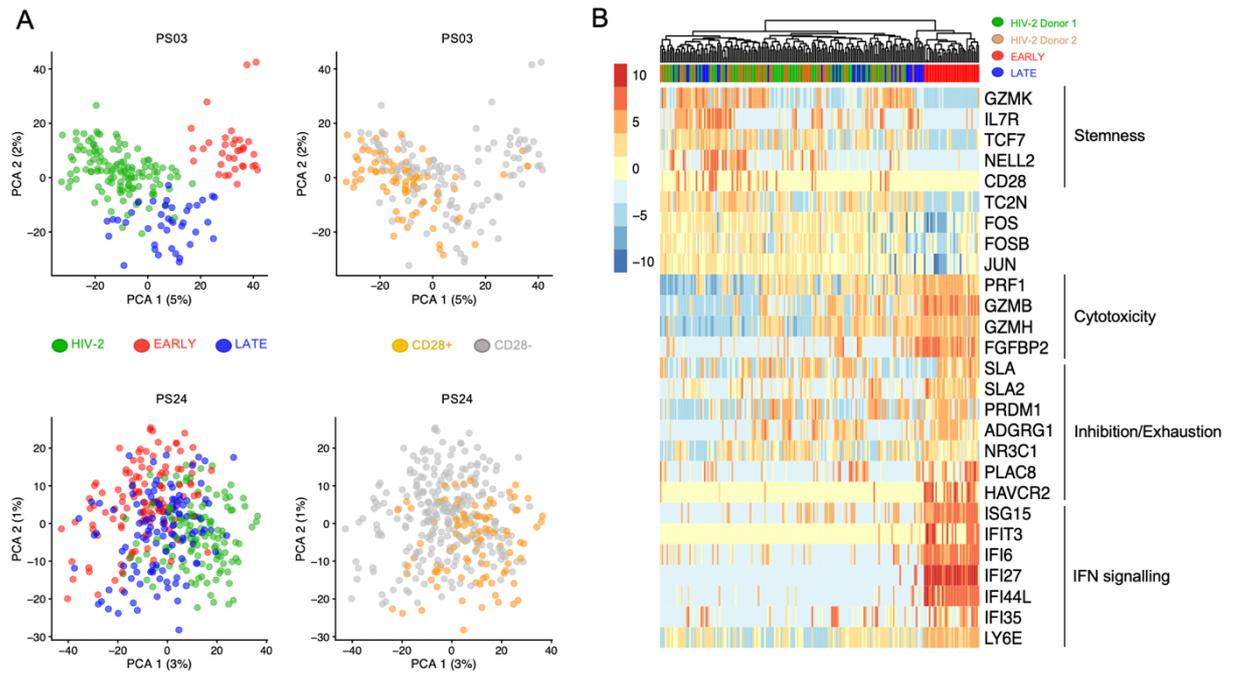


Figure 40 - Comparaison du transcriptome de LT CD8 spécifiques de VIH-1 et VIH-2. (A) PCA du transcriptome des réponses LT CD8 spécifiques de VIH-1 et VIH-2 colorées en fonction du TP (gauche) ou de l'expression de CD28 déterminée par cytométrie en flux (droite). (B) Heatmap de gènes associés à la stemness, cytotoxicité, inhibition/épuiement et signalisation IFN.

5. Caractérisation clonotypique de la réponse LT CD8 spécifiques du virus.

Nous avons donc observé des modifications phénotypiques et transcriptomiques sur les LT CD8 spécifiques du virus à LATE associées à un profil de différenciation précoce et à la stemness correspondant à des caractéristiques déjà décrites chez des individus capables de contrôler l'infection sans traitement. Cette observation soulève la question de l'origine de ces cellules : proviennent-elles d'une adaptation de la réponse LT CD8 face à une mutation d'échappement du virus ? D'une réversion de l'état d'épuisement grâce au contrôle de la réplication virale par le traitement ? De l'apparition de nouveaux clones avec les propriétés décrites plus haut ?

5.1 Les réponses LT CD8 spécifiques à LATE ne sont pas associées à l'apparition de mutations virales.

Pour tenter de répondre à la première question, nous avons séquencé le virus sur les épitopes étudiés pour les individus PS03 et PS24 ainsi que pour trois individus supplémentaires de la cohorte pour lesquels nous disposons d'assez d'échantillons. Hormis l'apparition entre 1992 et 1996 d'une mutation K94M sur l'épitope FL8 chez PS24 et qui coexiste avec la séquence *wild-type* (WT) jusqu'à 2016, et des modifications de la séquence RY10 chez PS17 à chaque point du suivi, les séquences virales des épitopes reconnus par la réponse LT CD8 sont remarquablement stables tout au long du suivi pour la plupart des individus (Figure 41, Annexe 5). Ces données suggèrent que les caractéristiques observées à LATE ne dépendent pas de l'apparition d'une nouvelle réponse LT CD8 spécifique d'un mutant d'échappement.

PS03		PS24		
Time-point	B*57-KF11 (Gag ₁₆₂₋₁₇₂)	Time-point	B*08-EI8 (Gag ₂₆₀₋₂₆₇)	B*08-FL8 (Nef ₉₀₋₉₇)
HXB2	KAFSPEVIPMF	HXB2	EIYKRWII	FLKEKGGL
1991 (EARLY)	-----	1992 (EARLY)	-----	-----
1994 (INT)	-----	1996 (INT)	-----	----M---
2012	-----	2012	-----	----K---
2016 (LATE)	-----	2016 (LATE)	-----	----M---

Figure 41 - Évolution de la séquence virale sur les épitopes reconnus par les réponses LT CD8 de PS03 et PS24. Comparaison des séquences épitopiques à chaque TP avec la souche virale de référence HXB2. Un tiret signifie l'absence de mutation par rapport à la référence. Les mutations sont indiquées en rouge.

5.2 Les réponses LT CD8 spécifiques à LATE sont associées à l'apparition de nouveaux clonotypes.

Nous avons ensuite réalisé une étude approfondie du répertoire TCR des réponses B*08-EI8, B*8-FL8 et B*57-KF11 pour écarter ou démontrer que le profil observé à LATE provient de l'apparition de nouveaux clones. La réponse B*08-FL8 chez PS24 montre un profil particulier. On observe à EARLY la dominance d'un clonotype défini par les séquences *CASSTGTGSAQETQYF* et *CAVRGSGTYKYIF* pour les régions CDR3 des chaînes β et α respectivement (90 % de la réponse) (clone violet, Figure 42A). Quatre ans plus tard à INT, la proportion de ce clonotype diminue jusqu'à 57 % tout en restant le clonotype majoritaire de la réponse. En revanche, on observe à LATE l'apparition d'un nouveau clonotype composant 45 % de la réponse. Ce clonotype est défini par les séquences *CASSEFGAAVYEQYF* et *CAVREAGGYQKVTF* pour les régions CDR3 des chaînes β et α respectivement. D'une manière intéressante les gènes associés aux chaînes du TCR des deux clones sont distincts : le « vieux clone » (celui persistant depuis EARLY, violet) est défini par TRBV5-6/TRBJ2-5 pour la chaîne β et TRAV12-2/TRAJ40 pour la chaîne α tandis que le « nouveau clone » (apparu entre INT et LATE, orange) est défini par les gènes TRBV2/TRBJ2-7 pour la chaîne β et TRAV3/TRAJ13 pour la chaîne α (Figure 42B, Annexe 6).

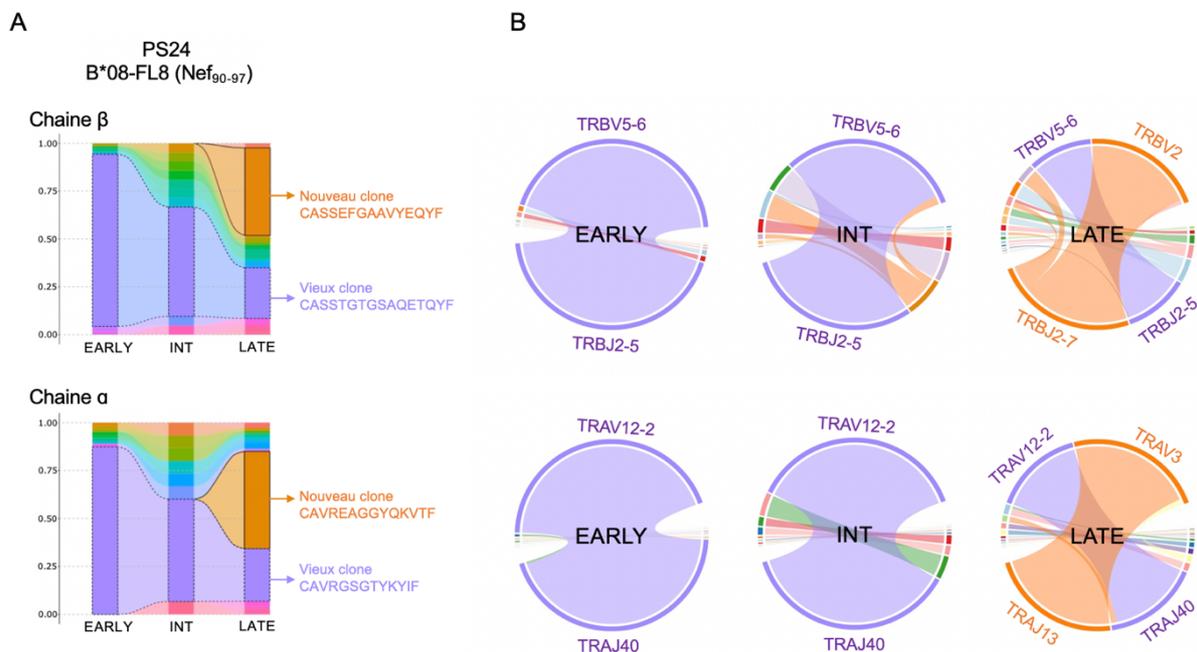


Figure 42 - Évolution clonotypique de la réponse B*08-FL8 chez PS24 au cours du temps. (A) Évolution de la région CDR3 pour la chaîne β (haut) et la chaîne α (bas) de la réponse B*08-FL8 au cours du temps. Chaque couleur représente une région CDR3 distincte. Par souci de clarté les chaînes β et α appariées sont colorées de la même couleur. (B) Évolution des gènes utilisés pour la chaîne β (haut) et α (bas) des TCR de la réponse B*08-FL8 au cours du temps. 70, 21 et 83 cellules analysées à EARLY, INT et LATE pour la chaîne β . 63, 15 et 73 cellules analysées à EARLY, INT et LATE pour la chaîne α .

La réponse B*08-EI8 de PS24 montre également des modifications majeures de sa composition clonotypique. Les premières années du suivi sont dominées par 5 clonotypes présents aussi bien à EARLY que à INT (numérotés de 1 à 5 Figure 43A). On observe d'ailleurs un biais en faveur de l'utilisation du gène TRBV2 : ce gène est utilisé par 3 des 5 clonotypes. De la même manière les gènes associés à la chaîne α sont biaisés en faveur de TRAJ34 et TRAJ29 (Figure 43B). Sur les 5 principaux clones initialement présents au début du suivi seul le clone 1 est toujours présent 25 ans après le premier prélèvement, représentant 20 % de la réponse à LATE. Le reste de la réponse est composé de nouveaux clones apparus entre INT et LATE. Les deux nouveaux clones majeurs sont le clone 6, défini par les gènes TRBV9/TRBJ1-2 pour la chaîne β et TRAV21/TRAJ57 pour la chaîne α (16 % de la réponse), et le clone 7 défini par les gènes TRBV20-1/TRBJ2-7 pour la chaîne β et TRAV20/TRAJ16 pour la chaîne α (14 % de la réponse) (clone 6 en vert, clone 7 en violet, Figures 43A&B, Annexe 7). Il est important de rappeler que nous n'avons pas détecté de mutation sur l'épitope EI8 au cours du suivi. Cela suggère que les modifications de la composition clonotypique ne dépendent pas d'une mutation d'échappement du virus.

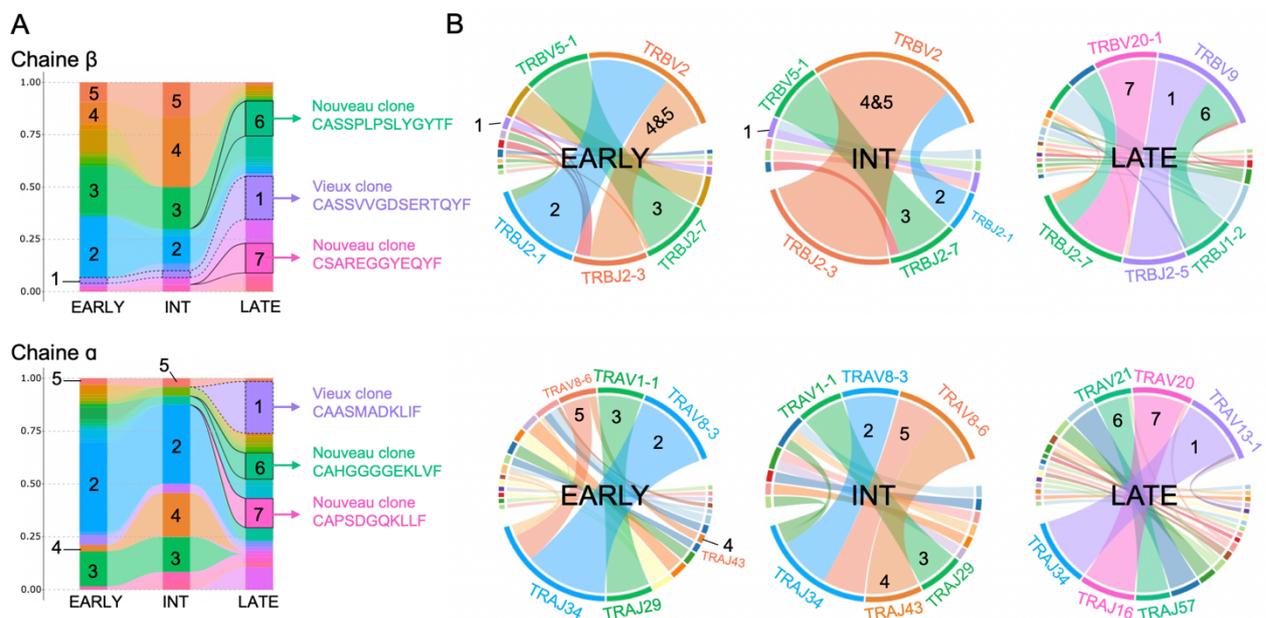


Figure 43 - Évolution clonotypique de la réponse B*08-EI8 chez PS24 au cours du temps. (A) Évolution de la région CDR3 pour la chaîne β (haut) et la chaîne α (bas) de la réponse B*08-EI8 au cours du temps. Chaque couleur représente une région CDR3 distincte. Par souci de clarté les chaînes β et α appariées sont colorées de la même couleur. (B) Évolution des gènes utilisés pour la chaîne β (haut) et α (bas) des TCR de la réponse B*08-EI8 au cours du temps. 75, 30 et 78 cellules analysées à EARLY, INT et LATE pour la chaîne β . 66, 24 et 65 cellules analysées à EARLY, INT et LATE pour la chaîne α .

La réponse B*57-KF11 à EARLY est dominée à 73 % par un clonotype défini par les séquences *CASSLSSSNQPQHF* et *CAMRSPPGNMLTF* pour les régions CDR3 des chaînes β et α respectivement (clone vert, Figure 44A). Après des années de traitement on observe à LATE l'apparition d'un nouveau clone dominant (81 % de la réponse) défini par les séquences *CASSLAGDLQPQHF* et *CAMRAGGTSYGKLTf* pour la région CDR3 des chaînes β et α respectivement (clone marron, Figure 44A). D'une manière surprenante, les gènes impliqués dans les chaînes β et α du TCR sont similaires à l'exception du gène TRAJ de la chaîne α : TRAJ39 pour le vieux clone et TRAJ52 pour le nouveau clone (Figure 44B, Annexe 8).

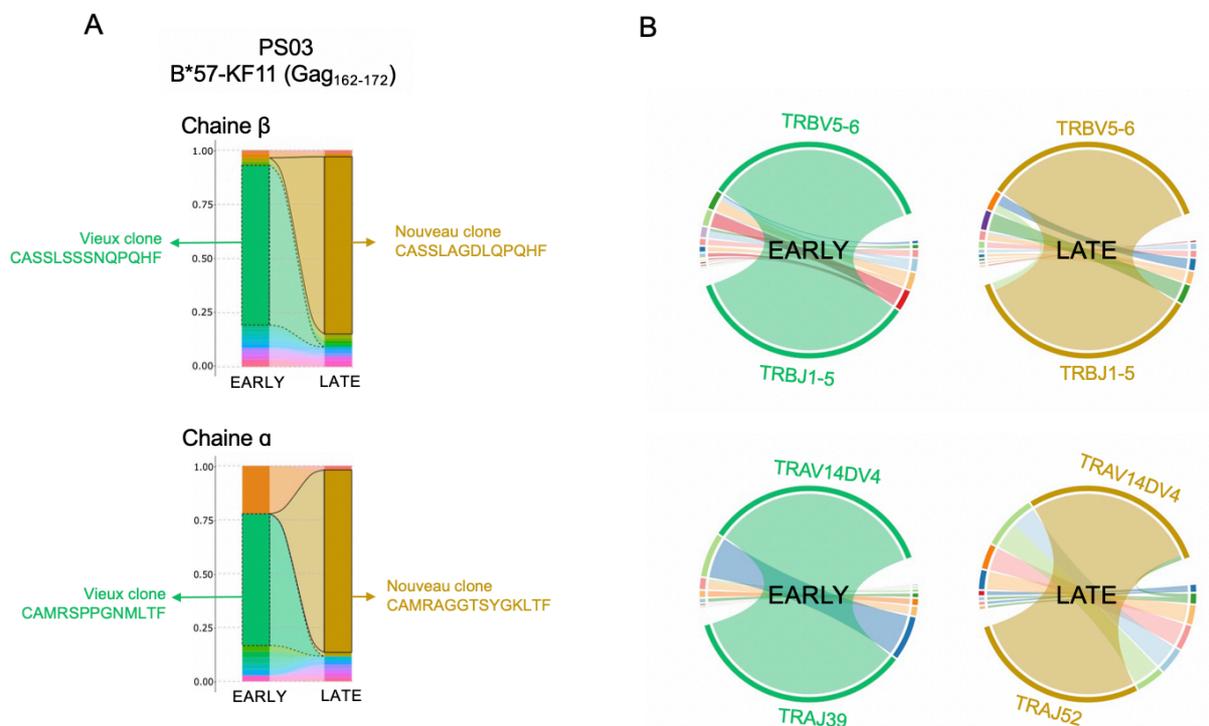


Figure 44 - Évolution clonotypique de la réponse B*57-KF11 chez PS03 au cours du temps. (A) Évolution de la région CDR3 pour la chaîne β (haut) et la chaîne α (bas) de la réponse B*57-KF11 au cours du temps. Chaque couleur représente une région CDR3 distincte. Par souci de clarté les chaînes β et α appariées sont colorées de la même couleur. (B) Évolution des gènes utilisés pour la chaîne β (haut) et α (bas) des TCR de la réponse B*57-KF11 au cours du temps. 57 et 66 cellules analysées à EARLY et LATE pour la chaîne β . 36 et 52 cellules analysées à EARLY et LATE pour la chaîne α .

Enfin, nous avons également caractérisé la composition clonotypique de la réponse B*53-TL9 des individus infectés par VIH-2. Nous avons mis en évidence l'existence d'un TCR public partagé par les deux individus infectés par VIH-2 (JFFT et XQXH). Le TCR en question est dominant chez les deux individus, représentant 77 et 71 % de la réponse B*53 pour JFFT et XQXH respectivement. Ce TCR est défini par les séquences *CASSLTGRNSPLHFYF* et *CILALYNQGGKLIFF* pour la région CDR3 des chaînes β et α respectivement (Figure 45A). De plus, il existe un biais important en faveur de l'utilisation de TRBV27 : même les clones sous-dominants ont une chaîne β utilisant TRBV27 (Figure 45B). A notre connaissance il s'agit de la première démonstration de l'existence d'un TCR public chez des individus infectés par VIH-2.

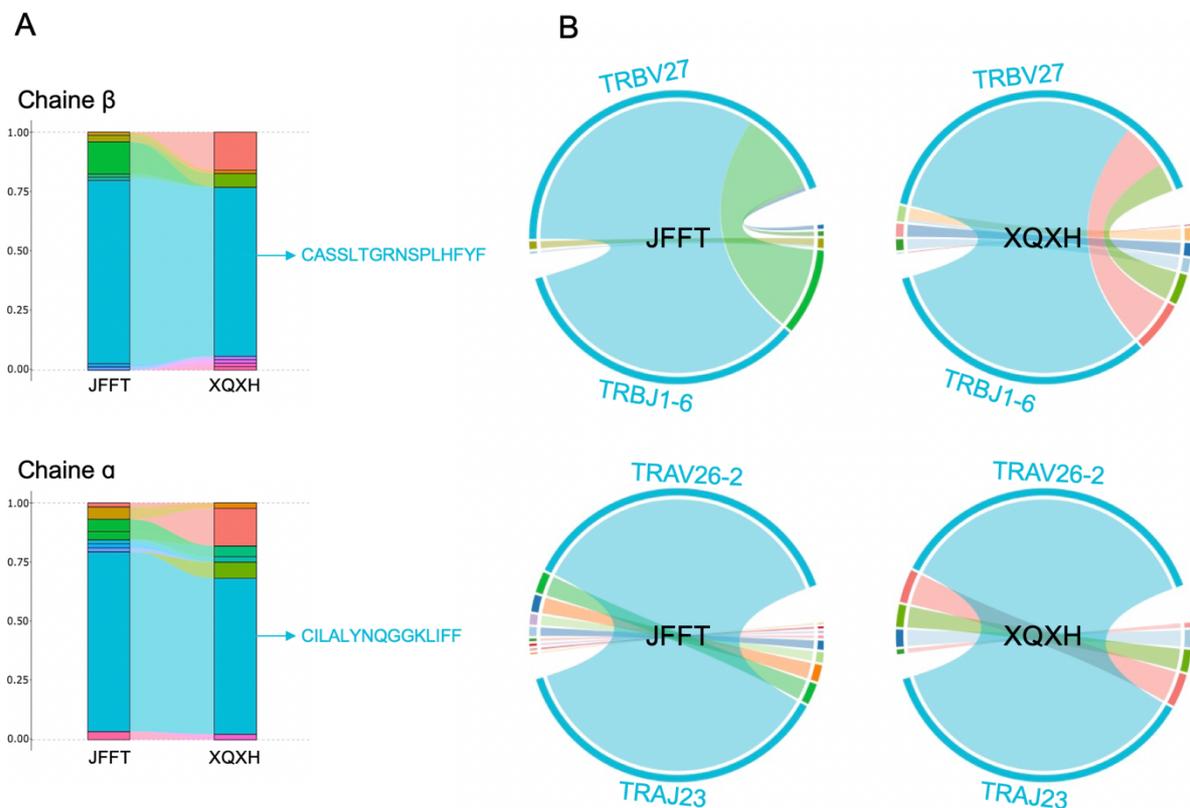


Figure 45 - Composition clonotypique de la réponse B*53-TL9 chez deux individus infectés par VIH-2. (A) Région CDR3 pour la chaîne β (haut) et la chaîne α (bas) de la réponse B*53-TL9 de JFFT et XQXH. Chaque couleur représente une région CDR3 distincte. Par souci de clarté les chaînes β et α appariées sont colorées de la même couleur. (B) Utilisation des gènes de la chaîne β (haut) et α (bas) des TCR de la réponse B*53-TL9 de JFFT et XQXH. 74 et 69 chaînes β analysées pour JFFT et XQXH. 58 et 44 chaînes α analysées pour JFFT et XQXH.

6. Analyse comparative des vieux et nouveaux clones.

Ainsi, l'étude de la composition clonotypique des réponses B*08-FL8, B*08-EI8 et B*57-KF11 nous a permis d'identifier des « vieux » et « nouveaux » clones en fonction de leur présence à EARLY ou LATE dans chacune des réponses étudiées. Au vu de l'ancienneté de certains clones (25 ans pour le clonotype TRBV5-6/TRBJ2-5 de la réponse B*08-FL8 par exemple) nous avons cherché à évaluer s'il était possible de différencier les vieux et nouveaux clones sur la base de l'expression de CD28, notre paramètre initial associé au phénotype des cellules à LATE.

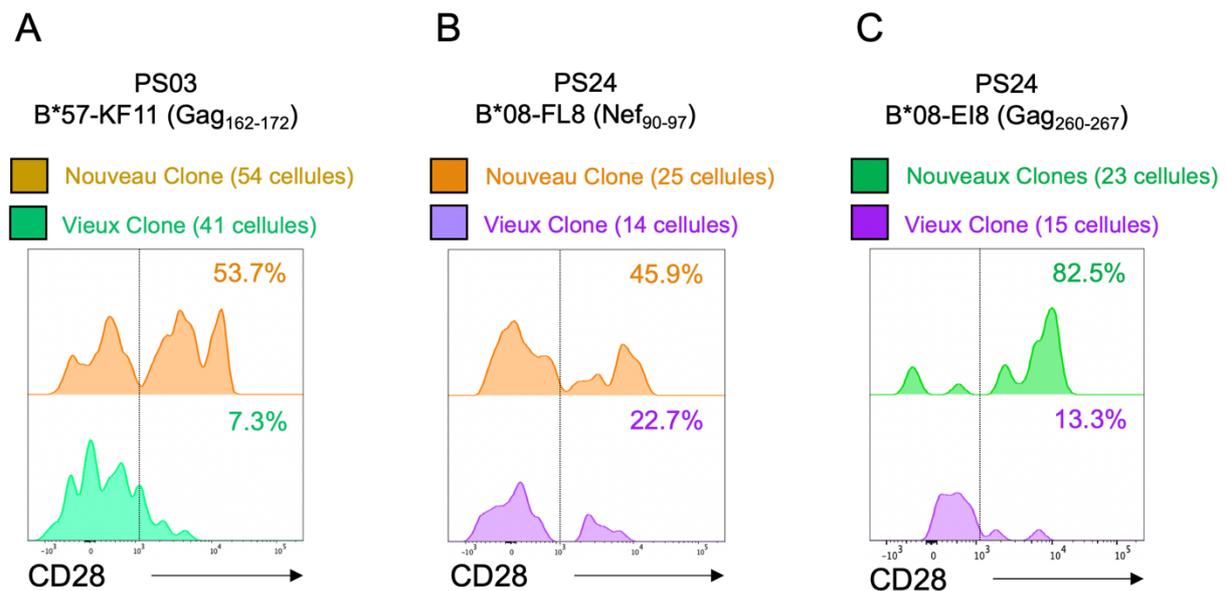


Figure 46 - Expression différentielle de CD28 par les vieux et nouveaux clones. Expression de CD28 par les vieux et nouveaux clones des réponses B*57-KF11 (A), B*08-FL8 (B) et B*08-EI8 (C). Les nouveaux clones analysés pour la réponse B*08-EI8 correspondent aux clones 6 et 7 indiqués dans la figure 43. Le seuil de positivité a été déterminé en fonction de l'expression de CD28 par les LT CD8 totaux de chaque individu.

Nous observons dans un premier temps que le nouveau clone de la réponse B*57-KF11 se distingue par une expression accrue de CD28 (Figure 46A). Ce résultat est cohérent : le vieux clone a été identifié à EARLY lorsque PS03 n'était pas sous traitement. La réplication virale importante a probablement induit la différenciation des LT CD8 et la perte d'expression de CD28. En revanche, les vieux et nouveaux clones des réponses B*08-FL8 et B*08-EI8 ont tous été isolés à LATE, un TP ou PS24 est sous trithérapie depuis 15 ans. On observe pourtant que les clones ayant persisté pendant des années sont caractérisés par une expression réduite de CD28 par comparaison avec les nouveaux clones (22.7 % vs 45.9 % pour la réponse B*08-FL8 et 13.3 % vs 82.5 % pour la réponse B*08-EI8) (Figures 46B&C).

Puisque nous avons été en mesure d'observer une différence phénotypique entre les vieux et nouveaux clones, nous avons également recherché des différences au niveau transcriptomique. A la vue du nombre de cellules dans chaque groupe la réponse B*08-FL8 est la mieux adaptée. Une analyse *sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis* (sPLS-DA) sépare les deux clones sur l'axe 1 (Figure 47A). Les 50 gènes associés à l'axe 1 sont représentés sous forme de Heatmap dans la Figure 47B. Sur les 50 gènes, 42 sont associés au vieux clone. On distingue parmi eux *CD160*, *NR3C1* ou encore *MAT2A*, trois gènes ayant été associés à l'épuisement des LT CD8. *Cd160* est un récepteur d'inhibition, *Nr3c1* code pour un récepteur de glucocorticoïde préférentiellement exprimé par les LT CD8 infiltrant les tumeurs (TIL) épuisés, et *MAT2A* code pour une enzyme impliquée dans le métabolisme de la méthionine et dans l'épuisement des LT CD8 via la production de S-adenosylmethionine (SAM) ⁴⁵²⁻⁴⁵⁴. On distingue également une expression supérieure des gènes *IFNAR1* et *TRIM21* associés à la réponse IFN. A l'inverse, sur les peu de gènes associés au nouveau clone on distingue *Traf3ip3* dont l'expression est augmentée dans les précurseurs mémoires par comparaison avec les LT CD8 effecteurs terminaux ⁴⁵⁵.

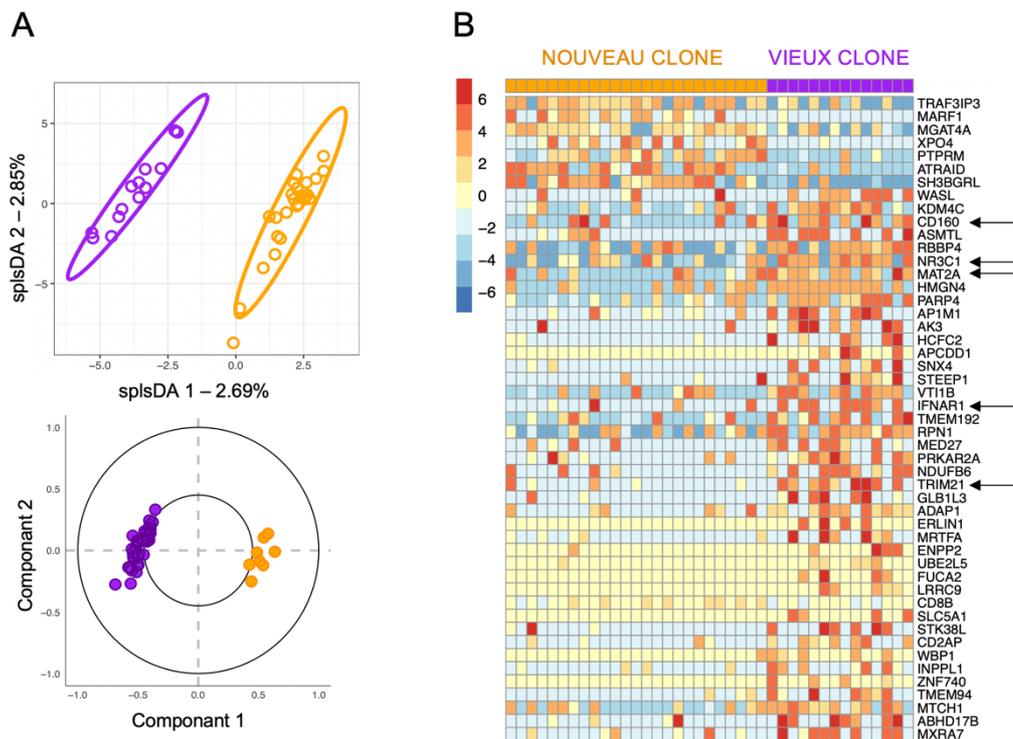


Figure 47 - Détection des gènes associés au nouveau ou vieux clone par sPLS-DA. (A) Représentation des deux clonotypes sur les deux premières composantes de la sPLS-DA (haut) et projection des gènes associés à la composante 1 sur un cercle de corrélation (bas). (B) Heatmap des 50 gènes associés à la composante 1.

Pour confirmer ces résultats nous avons utilisé l’algorithme GSEA pour identifier des voies de signalisation associées aux vieux et nouveaux clones. L’analyse GSEA révèle 3 voies de signalisation significativement enrichies dans le vieux clone : la signalisation IL6-JAK/STAT3, la signalisation IFN et la régulation négative de la réponse immunitaire. Par ailleurs, certaines voies de signalisation que nous avons précédemment associées à EARLY semblent être également enrichies dans le vieux clone, notamment les voies de signalisation de l’apoptose et de la stabilisation de p53, suggérant que le vieux clone a partiellement gardé une signature associée à l’épuisement (Figure 48A). A l’inverse, bien que non significatif, les cellules du nouveau clone semblent montrer une signature transcriptomique proche de cellules peu différenciées (Figure 48B). Conjointement l’analyse phénotypique et transcriptomique des clones suggèrent que le profil des LT CD8 observé à LATE ne dépend pas d’une amélioration fonctionnelle de vieux clones mais bien de l’apparition de nouveaux clonotypes avec des propriétés distinctes, montrant des caractéristiques associées à la différenciation précoce et la stemness.

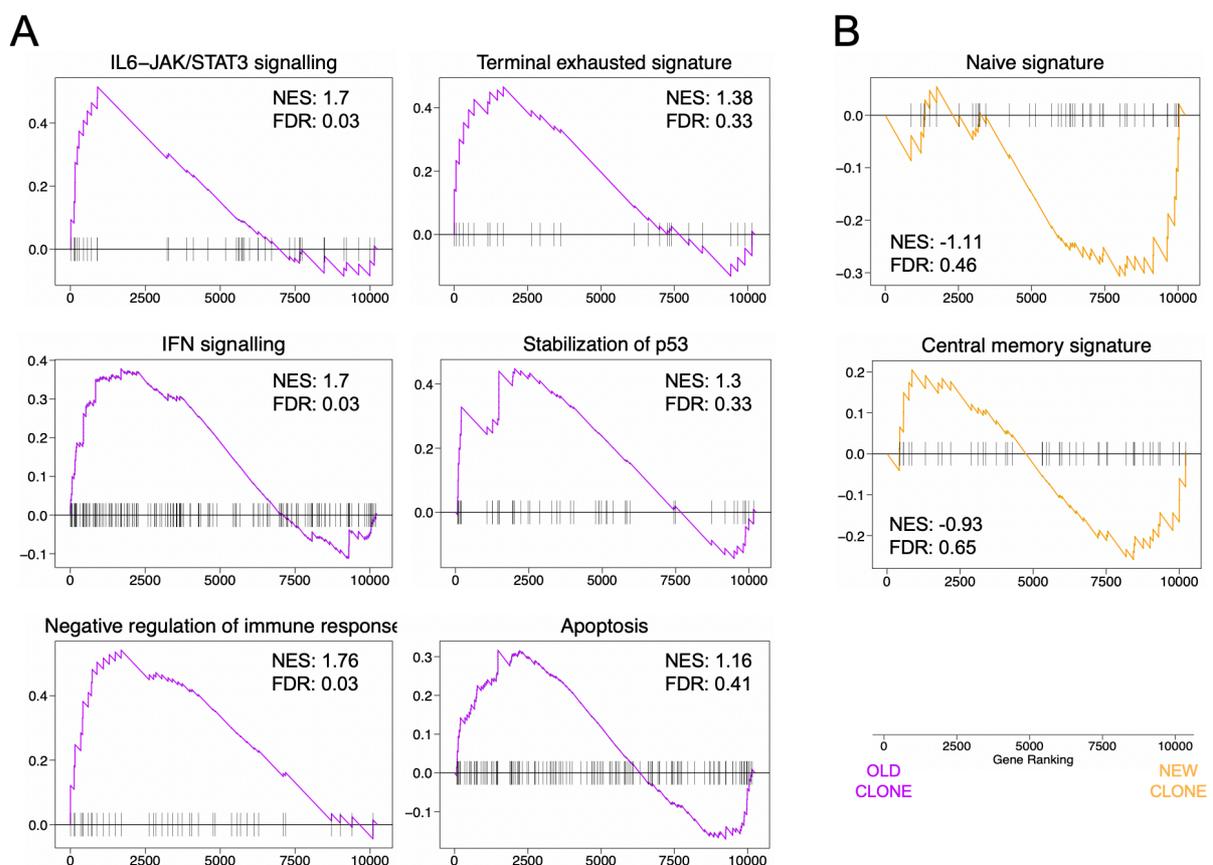


Figure 48 - Voies de signalisation associée au vieux ou nouveau clone de la réponse B*08-FL8. Analyse GSEA montrant l’enrichissement de voies de signalisation associé au vieux (A) ou au nouveau (B) clone de la réponse B*08-FL8.

7. Expansion *in vitro* des LT CD8 spécifiques du virus de patients traités ou non traités.

Le fait que ces individus aient pu générer de nouvelles réponses LT CD8 après des années de traitement et malgré un vieillissement immunitaire significatif est une observation encourageante concernant le potentiel de ces cellules à participer au contrôle du virus. La simple présence de ces clones n'est toutefois pas une garantie de protection. Ces individus n'ont pas contrôlé la charge virale avant traitement, il est probable qu'ils ne la contrôleront pas non plus en cas d'interruption du traitement. Par ailleurs, le faible nombre de ces nouveaux clones *in vivo* limite probablement leur pertinence dans un contexte de contrôle efficace de l'infection. A titre de comparaison, le nouveau clone TRBV2/TRBJ2-7 représente 45 % de la réponse B*08-FL8 chez PS24 à LATE, alors que cette même réponse représente seulement 0.06 % des LT CD8 totaux (Figure 42 et Annexe 3). Pour pallier à ces problématiques il serait pertinent de chercher, d'une part, à induire l'expansion de ces clones pour en augmenter le nombre, et d'autre part, à induire leurs fonctions effectrices pour augmenter leur capacité à contrôler la réplication virale, dans le contexte d'approche shock and kill. Pour y parvenir nous avons utilisé une approche développée initialement dans notre laboratoire pour étudier l'induction de réponses LT CD8 à partir de cellules naïves (« *priming* ») et l'avons adaptée pour étudier l'induction de réponses LT CD8 mémoires (« *boosting* ») ^{440,441}. Brièvement, cette approche repose sur un modèle de culture *in vitro* à partir de PBMC totaux et dépend de l'ajout de cytokines inflammatoires ou d'adjuvants pour induire la maturation des DCs et améliorer l'expansion et l'acquisition de fonctions effectrices par les LT CD8 mémoires spécifiques du virus, en présence d'antigènes (peptide). Plusieurs cytokines et adjuvants ont été présélectionnés en fonction de leur efficacité dans le modèle du priming (cGAMP, TLR8L ou encore IL-12). Dans ce modèle l'acquisition de fonctions effectrices des LT CD8 tétramères + est évaluée après 10 jours de culture par l'expression du facteur de transcription T-bet, et l'expression des molécules cytolytiques GzmB et perforine. Cette approche nous permet donc d'évaluer la capacité de certains adjuvants à induire l'expansion et l'acquisition de fonctions effectrices par les LT CD8 mémoires spécifiques du virus, mais également à comparer entre les individus traités et non traités pour évaluer la capacité du traitement à préserver les capacités fonctionnelles des LT CD8. Les échantillons de patients IMMUNOCO étant en trop petites quantités aux différents points de suivi, nous avons étudié des échantillons d'individus non traités (avec une charge virale comprise entre 40 et 50.000 copies/mL) et d'individus traités efficacement depuis plusieurs années (médiane

de 5 ans sans répllication virale), pour nous rapprocher des conditions EARLY et LATE. A l'aide de cette approche, nous avons évalué dans un premier temps l'impact de différentes cytokines ou adjuvants sur l'expansion des réponses LT CD8 mémoires spécifiques du virus (Figure 49A). On observe une fréquence supérieure *ex vivo* des LT CD8 tétramère + chez les individus non traités par comparaison avec les individus traités, comme attendu due à la différence de charge virale entre les deux groupes. Pourtant, après stimulation avec n'importe quelle condition, la fréquence de LT CD8 tétramère + est la même chez les individus traités et non traités. Cela suggère un potentiel d'expansion supérieur chez les individus traités. On distingue également que sur l'ensemble des adjuvants/cytokines testés, trois semblent induire une meilleure expansion indépendamment du statut du traitement : TLR8L ($p = 0.004$), IL-12 ($p = 0.013$) et IL-15 ($p = 0.01$) (Figure 49B).

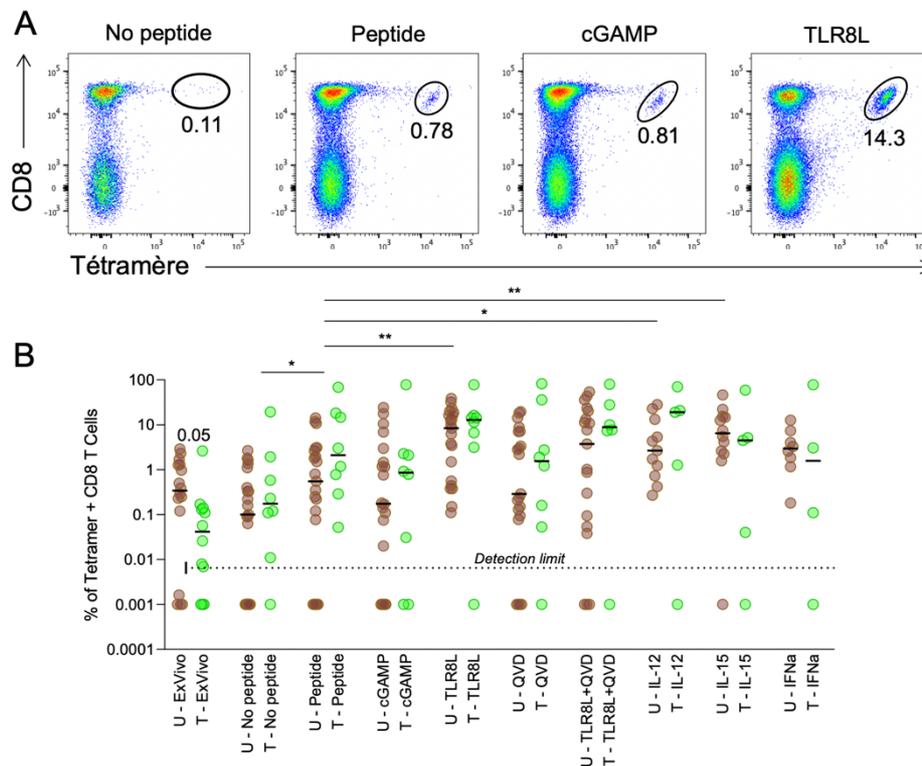


Figure 49 - Expansion des LT CD8 tétramères + après stimulation. (A) Marquages représentatifs de l'expansion de LT CD8 tétramère + après stimulation sous différentes conditions (Pas de peptide, peptide seul, peptide + cGAMP, peptide + TLR8L). Marquage issu de l'individu PS14 à LATE (réponses A*03-QK10). (B) Quantification de l'expansion des LT CD8 mémoires d'individus non traités (marron, U « untreated ») ou traités (vert, T « treated ») après stimulation dans le modèle d'expansion *in vitro*. Les p-values sous forme de barre indiquent la significativité entre les conditions (peptide vs TLR8L par exemple), la significativité entre les groupes traités/non-traités est indiquée au-dessus des points. Chaque point représente une population LT CD8 tétramère+ distincte. La barre indique la médiane. La significativité a été évaluée avec un test de Mann-Whitney.

Nous avons également évalué l'acquisition de fonctions effectrices, notamment en mesurant l'expression de GzmB par ces cellules (Figure 50A). D'une manière intéressante l'ajout de peptide seul est capable d'induire l'expression de GzmB dans 93 % des LT CD8 mémoires tétramère + des individus traités contre seulement 72 % pour ceux non-traités ($p = 0.03$). Ces données suggèrent une efficacité réduite des LT CD8 d'individus non traités à exprimer GzmB après stimulation, d'autant plus que les LT CD8 tétramères *ex vivo* des individus non traités semblent exprimer plus de GzmB que la même population chez les individus traités (non significatif, $p = 0.14$). L'ajout de TLR8L seul ou accompagné de la molécule anti-apoptotique QVD augmente significativement l'expression de GzmB quel que soit le statut du traitement ($p = 0.01$ et $p = 0.01$). Enfin, alors qu'IL-15 permet une expansion importante, seulement 48 % des cellules expriment GzmB ($p = 0.003$) (Figure 50B).

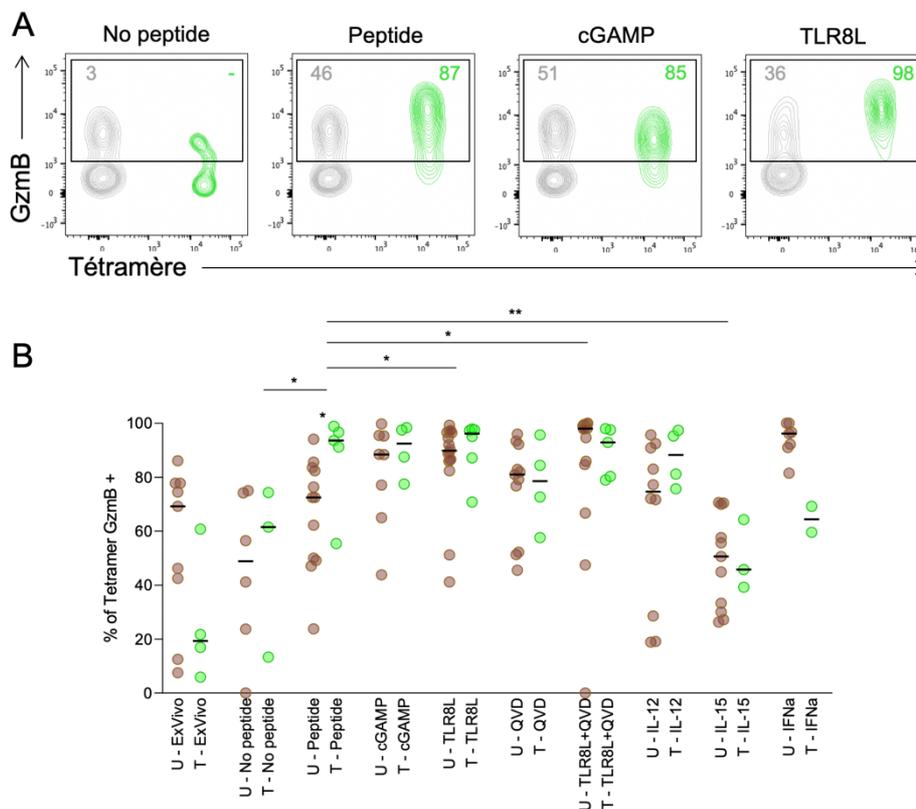


Figure 50 – Expression de GzmB par les LT CD8 tétramères après stimulation. (A) Marquages représentatifs de l'expression de GzmB par les LT CD8 tétramères + après stimulation sous différentes conditions (Pas de peptide, peptide seul, peptide + cGAMP, peptide + TLR8L). Les cellules grises représentent les LT CD8 totaux et les cellules vertes la population tétramère + Le pourcentage d'expression de GzmB est indiqué dans les coins supérieurs. Marquage issu de l'individu PS14 à LATE (réponses A*03-QK10). (B) Expression de GzmB par les LT CD8 tétramères + d'individus non traités (marron, U « untreated ») ou traités (vert, T « treated ») après stimulation. Les p-values sous forme de barre indiquent la significativité entre les conditions (peptide vs TLR8L par exemple), la significativité entre les groupes traités/non-traités est indiquée au-dessus des points. Chaque point représente une population LT CD8 tétramère+ distincte. La barre indique la médiane. La significativité a été évaluée avec un test de Mann-Whitney. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

En parallèle du GzmB nous avons également évalué l'expression de perforine (Figure 51A). Alors que l'expression de perforine est initialement faible en l'absence de stimulation, l'ajout du peptide seul régule à la hausse son expression ($p = 0.0003$). De la même manière que pour le GzmB, les individus traités parviennent à maintenir une population LT CD8 tétramères + exprimant la perforine plus importante (93 vs 76 % de LT CD8 tétramères +, $p = 0.02$). Par ailleurs, les adjuvants et cytokines ayant modulé l'expression de GzmB montrent les mêmes résultats pour la perforine : TLR8L et TLR8L + QVD permettent une expression accrue ($p = 0.001$ et $p = 0.002$ respectivement) tandis qu'IL-15 conduit à une expression significativement plus basse de la perforine ($p = 0.01$) (Figure 51B).

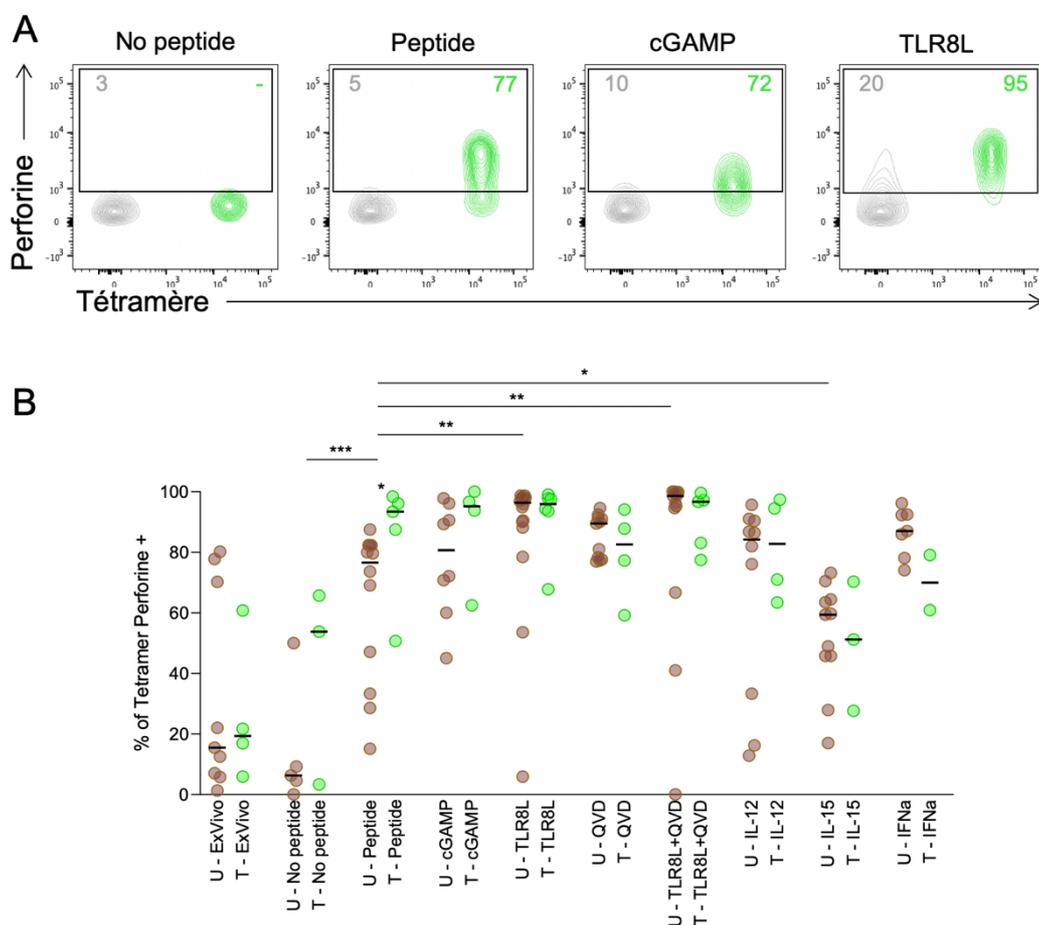


Figure 51 - Expression de perforine par les LT CD8 tétramères après stimulation. (A) Marquages représentatifs de l'expression de perforine par les LT CD8 tétramères + après stimulation sous différentes conditions (Pas de peptide, peptide seul, peptide + cGAMP, peptide + TLR8L). Les cellules grises représentent les LT CD8 totaux et les cellules vertes la population tétramère + Le pourcentage d'expression de perforine est indiqué dans les coins supérieurs. Marquage issu de l'individu PS14 à LATE (réponses A*03-QK10). (B) Expression de perforine par les LT CD8 tétramères + d'individus non traités (marron, U « untreated ») ou traités (vert, T « treated ») après stimulation. Les p-value sous forme de barre indiquent la significativité entre les conditions (peptide vs TLR8L par exemple), la significativité entre les groupes traités/non-traités est indiquée au-dessus des points. Chaque point représente une population LT CD8 tétramère+ distincte. La barre indique la médiane. La significativité a été évaluée avec un test de Mann-Whitney. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Enfin, l'expression du facteur de transcription T-bet est très peu modulée en fonction des différentes conditions. On note toutefois que les patients traités montrent une proportion de LT CD8 tétramères + exprimant T-bet légèrement plus importante après stimulation par le peptide seul et par peptide/cGAMP (Figures 52A&B).

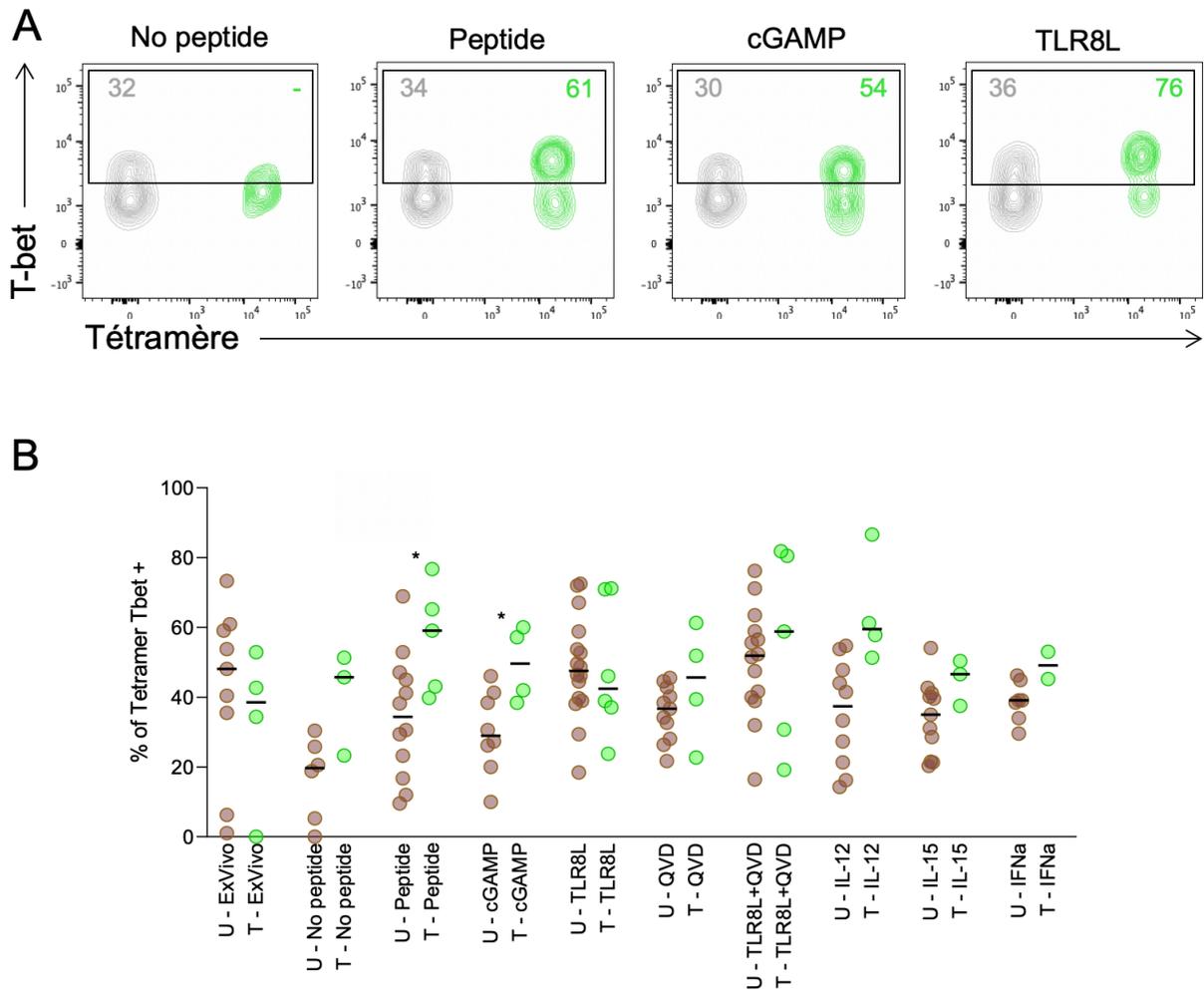


Figure 52 - Expression de T-bet par les LT CD8 tétramères après stimulation. (A) Marquages représentatifs de l'expression de T-bet par les LT CD8 tétramères + après stimulation sous différentes conditions (Pas de peptide, peptide seul, peptide + cGAMP, peptide + TLR8L). Les cellules grises représentent les LT CD8 totaux et les cellules vertes la population tétramère + Le pourcentage d'expression de T-bet est indiqué dans les coins supérieurs. Marquage issu de l'individu PS14 à LATE (réponses A*03-QK10). (B) Expression de T-bet par les LT CD8 tétramères + d'individus non traités (marron, U « untreated ») ou traités (vert, T « treated ») après stimulation. Les p-value sous forme de barre indiquent la significativité entre les conditions (peptide vs TLR8L par exemple), la significativité entre les groupes traités/non-traités est indiquée au-dessus des points. Chaque point représente une population LT CD8 tétramère+ distincte. La barre indique la médiane. La significativité a été évaluée avec un test de Mann-Whitney. (* $P < 0.05$).

A ce jour seuls les échantillons d'un petit nombre d'individus ont pu être inclus dans l'expérience d'expansion in vitro. Ces données restent donc très préliminaires. Il est toutefois possible d'observer des tendances malgré le faible effectif. Tout d'abord, les LT CD8 tétramères + d'individus traités semblent avoir un meilleur potentiel d'expansion et une capacité supérieure à acquérir des fonctions effectrices, principalement au travers de l'expression de GzmB et perforine. Ensuite, sur l'ensemble des adjuvants et cytokines testés, TLR8L apparaît comme le candidat le plus prometteur pour induire une réponse à fort potentiel effecteur pour cibler efficacement les cellules infectées.

Chapitre IV :

DISCUSSION

Après le succès de cART pour le traitement de la maladie, le prochain grand défi de la recherche VIH est la guérison des individus infectés. Cet objectif ambitieux nécessitera soit une éradication du réservoir si on cherche la guérison totale, soit une réduction significative de la taille du réservoir pour permettre une guérison fonctionnelle. Il est probable que les LT CD8 joueront un rôle important dans ces deux approches au vu de leur potentiel pour le contrôle de la réplication virale lorsque la réponse LT CD8 est optimale (comme chez les EC par exemple). Pour cette raison, il est important d'évaluer le potentiel des LT CD8 après plusieurs années de traitement et dans quelle mesure il est possible d'améliorer la fonctionnalité des LT CD8 spécifiques du virus.

Pendant l'infection non traitée à VIH, les LT CD8 montrent des fonctions effectrices réduites ainsi qu'une capacité de prolifération et un potentiel cytotoxique inférieur qui limite leur capacité à contrôler l'infection. La perte graduelle des fonctions effectrices, définie par la notion d'épuisement, est associée à l'expression soutenue et durable de plusieurs récepteurs d'inhibition (IR) comme PD-1, CD160 ou encore TIGIT ⁴⁵⁶. Puisque l'épuisement est partiellement provoqué par une stimulation antigénique chronique, l'initiation de cART devrait en théorie normaliser certains paramètres associés à l'épuisement. C'est en partie ce que l'on observe : la fréquence de LT CD8 spécifiques du virus exprimant CD160, PD-1 ou TIGIT est réduite après initiation du traitement ^{144,398}. Cependant cART ne permet pas une normalisation totale et les individus infectés par VIH maintiennent une fréquence de LT CD8 exprimant des IR plus importante que chez des individus séronégatifs ⁴⁵⁷. De plus les fonctions effectrices des LT CD8 restent sous-optimales : la capacité proliférative et la production de cytokines et molécules lytiques après stimulation par des antigènes de VIH sont réduites ⁴⁰². Ces cellules montrent également une capacité inférieure à contrôler la réplication virale après culture avec des LT CD4 autologues infectés ⁴⁵⁸. De manière importante le traitement à long terme n'est pas forcément associé à une amélioration significative de ce profil. Buggert et al ont montré dans une cohorte suédoise d'individus traités depuis plus de 10 ans par cART que les LT CD8 spécifiques du virus expriment toujours une quantité accrue de Eomes par rapport à T-bet ³⁵⁰. La régulation à la hausse du facteur de transcription Eomes est associée à l'expression d'IR et à une polyfonctionnalité réduite. A l'inverse, l'expression de T-bet (caractéristique des EC) est associée à une expression accrue de perforine et de GzmB suggérant une capacité cytotoxique supérieure. Ces observations suggèrent une fonctionnalité et un potentiel réduit pour la suppression virale, même après des années de traitement.

C'est donc dans ce contexte que nous avons commencé l'étude de la réponse LT CD8 des individus de la cohorte IMMUNOCO. Conjointement avec l'épuisement connu des LT CD8 et le vieillissement des individus de la cohorte, nous nous attendions à étudier la senescence de vieux LT CD8 mémoires. Pourtant, au lieu de montrer des marqueurs de senescence et d'épuisement des LT CD8, ces cellules présentent des caractéristiques associées à la différenciation précoce et la stemness au niveau phénotypique et transcriptomique. Au niveau phénotypique ces cellules expriment le co-récepteur CD28 indiquant un profil de différenciation précoce ⁴⁵⁹. CD28 est un récepteur de costimulation majeur requis pour l'activation optimale après reconnaissance de l'antigène, la prolifération et la survie des cellules T ⁴⁶⁰. La perte de l'expression de CD28 est un marqueur établi du vieillissement des LT CD8 ^{446,461}. Au niveau transcriptomique ces cellules expriment également le facteur de transcription *Tcf7*, codant pour TCF-1. TCF-1 est un régulateur important de la différenciation et de la persistance des LT CD8 mémoires dont l'expression est associée à la stemness et considérée comme essentiel pour l'efficacité des réponses LT CD8 anti-virales ou anti-tumorales ⁴⁶². Une expression importante de TCF-1 est une caractéristique de contrôle naturel de l'infection, aussi bien chez l'Homme que chez le singe, et corrèle avec une virémie plus faible chez les individus avec une charge virale détectable ^{354,357,463}. Par ailleurs, les individus ayant commencé le traitement tôt pendant la primo-infection présentent des LT CD8 avec un profil de différenciation précoce associé à la stemness et une expression accrue de TCF-1 ⁴¹⁰. Ainsi, le profil observé à LATE est évocateur d'une forme de « rajeunissement » des LT CD8 après plusieurs décennies d'infection traitée. Cette observation est d'autant plus surprenante que l'un des deux individus sur lequel le scRNAseq a été réalisé était âgé de 78 ans au moment de LATE. Ces observations soulèvent donc la question du mécanisme : comment expliquer ce profil chez des LT CD8 spécifiques du virus, normalement épuisés, chez des individus commençant à montrer des signes de vieillissement immunitaire ?

Plusieurs hypothèses peuvent être proposées. Nous avons dans un premier temps supposé que l'apparition d'une mutation d'échappement puisse induire la génération d'une nouvelle réponse LT CD8. Cette réponse en étant induite dans un environnement moins activé grâce au traitement et donc, plus favorable à l'établissement d'une réponse mémoire fonctionnelle, aurait alors pu persister jusqu'à LATE en maintenant des caractéristiques associées à la stemness. C'est une hypothèse envisageable d'autant plus que cART ralentit mais ne bloque jamais complètement la réplication virale. La pénétration des molécules

antirétrovirales n'est pas optimale dans certains tissus lymphoïdes ⁴⁶⁴. De plus, il existe des zones sanctuaires, notamment la zone folliculaire dans les ganglions lymphatiques, où le virus se réplique activement ^{465,466}. Pourtant le séquençage des séquences virales chez PS24 et PS03 ne révèle aucune modification des régions épitopiques reconnues, à l'exception de l'épitope FL8 chez PS24. Ces données suggèrent, au moins pour les réponses B*08-EI8 et B*57-KF11, que les changements observés à LATE, l'expression accrue de CD28 notamment, interviennent en l'absence de modifications virales majeures. Cela étant dit, il est important d'apporter certaines nuances. Tout d'abord, le séquençage des provirus a été fait selon le protocole de Sanger ce qui signifie que nous sommes en mesure de détecter seulement les populations provirales majoritaires (au-dessus de 15 à 20 % des séquences provirales séquencées). Il n'est donc pas exclu qu'un variant minoritaire puisse être à l'origine de la sélection des nouveaux clones. Bien qu'hypothétiquement possible, il est peu probable qu'un variant minoritaire puisse modifier à ce point la composition clonale des réponses B*08-EI8 et B*57-KF11, d'autant plus que l'épitope WT reste présent tout au long du suivi. Une autre limite potentielle réside dans le fait que nous avons séquencé les provirus au sein de cellules infectées provenant de PBMCs et donc du sang périphérique. Comme indiqué plus haut, la réplication virale intervient majoritairement dans les tissus lymphoïdes, en particulier dans les ganglions lymphatiques. Il n'est pas impossible que ces nouveaux clones puissent provenir de nouvelles réponses LT CD8 générées dans les tissus lymphoïdes pour faire face à l'apparition d'un mutant d'échappement sur place. Ce point en particulier est impossible à vérifier en l'absence de biopsies de tissus lymphoïdes, ce qui dépasse largement le cadre de cette étude.

Nous avons ensuite émis l'hypothèse que les caractéristiques observées à LATE découlent du traitement qui en contrôlant la réplication virale et l'activation chronique, aurait permis aux cellules hautement différenciées et épuisées de « récupérer » certaines caractéristiques associées à la stemness. Cette hypothèse paraît peu probable pour plusieurs raisons. D'abord, en prenant en compte le modèle de différenciation linéaire, les cellules très différenciées ont tendance à mourir par apoptose et ne se dédifférencient pas pour former des réponses mémoires fonctionnelles ³⁴³. De plus, nos connaissances actuelles sur l'épuisement ne vont pas non plus dans le sens d'une restauration des LT CD8 épuisés. Il est aujourd'hui admis que passé un certain stade, l'épuisement devient irréversible. Il a par exemple été montré que des LT CD8 isolés pendant la première semaine de l'infection murine à LCMV ont le potentiel de former une réponse mémoire fonctionnelle si transférés vers un hôte non-infecté. En revanche, si les mêmes cellules sont transférées au bout de 2 à 4 semaines, alors le

potentiel pour former une réponse mémoire fonctionnelle est perdu ^{467,468}. Des observations similaires ont également été faites dans le contexte d'infections chroniques virales humaines. Le cas de l'infection au virus de l'hépatite C (HCV) offre l'opportunité d'étudier l'épuisement de la réponse LT CD8 pendant l'infection chronique et après résolution de l'infection une fois les individus traités. D'une manière intéressante Yates *et al* montrent que la résolution de l'infection n'est pas associée à une amélioration de l'épuisement des LT CD8 spécifiques du virus. Au contraire les LT CD8 maintiennent une signature épigénétique associée à l'épuisement notamment au travers du facteur de transcription *Tox*, qui caractérise également les LT CD8 spécifiques du virus à EARLY dans notre étude ⁴⁶⁹. D'autres études ont montré qu'une stimulation antigénique répétée via le TCR provoque des modifications épigénétiques rendant le locus de PD-1 irrémédiablement accessible ⁴⁷⁰. Conjointement ces données suggèrent que l'épuisement ne fonctionne pas sur un modèle On/Off, mais s'installe progressivement avec la stimulation chronique jusqu'à devenir un état irréversible en l'absence d'intervention thérapeutique. C'est l'une des raisons qui poussent à initier cART le plus tôt possible. L'initiation précoce du traitement, en contrôlant la réplication virale, permet de limiter l'épuisement des LT CD8 et donc de préserver leur fonctionnalité.

Malheureusement l'initiation précoce du traitement n'est pas tout le temps possible, notamment pour les individus dont l'infection est antérieure aux développements des thérapies antirétrovirales et ceux vivant dans les pays en développement. Pour ces individus la capacité d'induire de nouvelles réponses (*de novo*) LT CD8 est cruciale, car cela permettrait de remplacer les réponses présentes depuis le début de l'infection et dont les fonctions effectrices sont altérées par l'épuisement. D'où notre dernière hypothèse : les caractéristiques de stemness observées à LATE sont associées à l'apparition de nouveaux clones. Malgré le nombre limité d'individus et de cellules étudiées, la caractérisation simultanée du TCR et du transcriptome de ces cellules semble valider cette hypothèse. Nos données semblent indiquer que le profil associé à la différenciation précoce et à la stemness observée à LATE provient de l'apparition et de l'expansion de nouveaux clones avec une expression accrue de CD28. Il est probable que les vieux clones présents pendant les premières années du suivi avec un profil différencié et épuisé aient graduellement disparu pour être remplacés par ces nouveaux clones démontrant des attributs fonctionnels supérieurs. Le traitement est probablement un acteur clé de ce phénomène. La diminution de la charge virale dans un contexte de reconstitution immune efficace a pu permettre l'induction de nouvelles réponses LT CD8 et la formation d'une réponse mémoire fonctionnelle similaire à ce que l'on observe dans le contrôle naturel

de l'infection. Puisque la composition clonotypique est un déterminant clé de l'efficacité des réponses LT CD8 anti-virales, l'apparition de nouveaux clones avec un potentiel de stemness supérieur peut avoir des implications pour le contrôle du virus et du réservoir chez ces individus ⁴⁷¹.

La capacité des individus infectés par VIH à produire de nouvelles réponses est une considération importante pour le traitement de la maladie, et un sujet de débat depuis quelques années. En effet, nos connaissances actuelles montrent une diminution significative des ressources immunes chez les individus infectés. De plus, l'âge a un effet confondant sur ces critères et agit en synergie avec l'infection pour réduire les capacités des individus infectés à produire de nouvelles réponses. L'altération de l'architecture du thymus et la contraction des compartiments de cellules naïves et de progéniteurs hématopoïétiques (CD34+) sont tout autant de facteurs qui contribuent à la réduction de la production thymique et de la capacité à générer de nouvelles réponses chez les individus infectés par VIH ⁴⁷²⁻⁴⁷⁴. L'apparition de nouveaux clones est donc une observation encourageante qui suggère une capacité d'adaptation du système immunitaire, même chez des individus âgés après plusieurs décennies d'infection à VIH.

Toutefois il est important de clarifier certains points et de compenser les limites de notre étude. Dans un premier temps, le faible nombre de patients implique la nécessité de vérifier si le profil observé est représentatif de l'ensemble des individus infectés par le virus, ou si cela concerne des cas isolés d'individus ayant réussi à maintenir les ressources immunitaires suffisantes pour induire de nouvelles réponses malgré les années. Après tout, il existe un biais de sélection important puisque nous avons sélectionné nos patients pour le scRNAseq en fonction de la présence ou non d'une population tétramère + significative. Dans un deuxième temps, il est également important de vérifier si ce profil de stemness est représentatif de l'ensemble des réponses spécifiques de VIH au sein de ces individus. Le fait que deux réponses spécifiques distinctes chez PS24 présentent un profil similaire pourrait aller dans ce sens. Toutefois, deux réponses chez un seul individu n'est pas suffisant pour conclure définitivement et il faudrait plus d'échantillons avec une caractérisation systématique des réponses dirigées contre plusieurs épitopes et protéines virales distinctes. En lien avec ce dernier point, il serait pertinent d'évaluer l'évolution de réponses LT CD8 spécifiques d'épitopes hautement conservés du virus, notamment sur la protéine structurale Gag. Il existe une littérature robuste montrant que les réponses LT CD8 sont hétérogènes au

regard de leur capacité à contrôler la réplication, et que ces différences peuvent s'expliquer en partie par la spécificité de la réponse. Les réponses ciblant Gag sont caractérisées par une polyfonctionnalité supérieure et corrèlent avec une charge virale plus faible, ce qui n'est pas le cas des réponses ciblant Env ⁴⁷⁵. Une explication plausible pour cette observation est le coût de l'adaptation pour le virus. Certaines mutations d'échappement viennent avec un prix trop élevé au regard de la réplication virale et de l'infectiosité du virion. C'est une considération importante car cela permettrait de distinguer si les nouveaux clones observés constituent des réponses LT CD8 dites « driver » capables de contrôler efficacement la réplication ou au contraire des réponses « passager » n'induisant pas une pression de sélection sur le virus et offrant une protection limitée ^{476,477}. Cette distinction est la raison pour laquelle la plupart des vaccins cherchant à induire une réponse LT CD8 efficace vise à induire des réponses spécifique de Gag ⁴⁷⁸.

Une stratégie naissante dans le contexte de l'infection à VIH est la reprogrammation. Cette stratégie consiste à modifier les cellules pour les doter des capacités qu'on estime importantes pour le contrôle de l'infection. Une étude récente a montré la faisabilité de cette approche dans le contexte de l'infection à VIH en reprogrammant les LT CD8 d'individus progressifs *in vitro* pour leur octroyer un potentiel de stemness supérieur. Dans cette étude l'utilisation d'un inhibiteur de GSK-3 appelé 6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO) a été capable de promouvoir l'expression de TCF-1 dans les LT CD8 totaux et spécifiques du virus après un traitement de 12 heures en culture, permettant à ces cellules de se différencier en T_{SCM} et T_{CM} (ou au moins d'arborer un phénotype correspondant à ces sous-populations). Après stimulation par le TCR les cellules traitées par BIO montrent une expression accrue de Bcl-6, CD127 ou encore Bcl-2 suggérant une résistance à l'apoptose et un potentiel de survie supérieur. Ces cellules sont également caractérisées par une expression réduite de divers gènes associés à l'épuisement (notamment les IR *Havcr2* et *Tim3*). D'une manière intéressante le traitement avec BIO a permis de générer des cellules avec une meilleure capacité suppressive vis-à-vis du virus et une polyfonctionnalité supérieure (principalement au travers de la production de TNF- α) ⁴⁷⁹. Cette étude n'est pas un cas isolé et plusieurs tentatives de reprogrammation des LT CD8 dans différents contextes (infection virale, cancer) existent ^{480,481}.

Un objectif de plus en plus important pour la reprogrammation des LT CD8 est l'induction ou la préservation du potentiel de stemness, principalement sous la dépendance

des T_{CM} et T_{SCM}. En effet les T_{CM} et T_{SCM} ont deux capacités importantes. D'une part elles maintiennent la capacité de se différencier en cellules effectrices pour afficher des fonctions effectrices. C'est un point important car la réduction de la taille du réservoir (dans une hypothétique stratégie de shock and kill efficace par exemple) nécessitera de fortes fonctions cytolytiques pour détruire les cellules du réservoir réactivées. D'autre part, les T_{CM} et T_{SCM} ont la capacité de s'auto-renouveler et de maintenir une population peu différenciée pouvant perdurer pendant des années ^{342,344}. La présence seule de cellules effectrices n'est pas une garantie suffisante de protection si ces cellules sont vouées à s'épuiser et à mourir par apoptose au bout de quelques semaines d'infection. La composante critique d'une réponse efficace est la capacité d'être maintenue sur le long terme. C'est la raison pour laquelle la plupart des immunothérapies efficaces dans le cadre du cancer sont associées à la stemness et au potentiel de prolifération des LT CD8. Une étude publiée dans Science a montré que le traitement de TIL avec des concentrations extracellulaires importantes en potassium limite les modifications épigénétiques associées à l'épuisement et à la différenciation tout en préservant un programme génétique associé à la stemness (incluant une expression accrue de TCF-1). Des LT CD8 traités de la sorte ont permis de diminuer significativement la croissance tumorale dans un modèle murin ⁴⁸². Il a également été montré dans le contexte du mélanome que la fréquence de LT CD8 *Tcf7+* intratumoral est associée à une meilleure survie et une meilleure réponse ⁴⁸³. Dans l'ensemble ces données montrent le rôle important de la stemness pour l'efficacité de la réponse LT CD8.

Le fait d'observer des LT CD8 avec des caractéristiques évocatrices de la stemness après plusieurs décennies d'infection est une observation encourageante. A certains égards, cette observation ressemble à une forme d'auto-reprogrammation du système immunitaire qui aurait généré de nouveaux clones pour remplacer les clones vieillissants et épuisés. Bien qu'encourageante, cette observation ne constitue pas la solution miracle pour l'éradication du réservoir ou même simplement une guérison fonctionnelle car plusieurs limitations subsistent. Dans un premier temps, la fréquence des nouveaux clones est faible. Le nouveau clone de la réponse B*08-FL8 représente 45 % d'une réponse qui représente elle-même 0.06 % des LT CD8 totaux. Pour la réponse B*08-EI8 c'est une proportion encore plus faible. Cela signifie que dans le contexte d'une interruption de traitement, ces nouveaux clones, à eux seuls, auront probablement un impact limité sur le contrôle de la réplication virale. Dans un deuxième temps, ces nouveaux clones se trouvent dans le même environnement qui a poussé les vieux clones vers la différenciation terminale et l'épuisement. Dans un contexte d'interruption du

traitement, il est donc probable que ces nouveaux clones subissent le même sort et s'orientent progressivement vers l'épuisement en l'absence d'intervention thérapeutique. En revanche, l'existence de ces clones avec un potentiel de stemness offre une fenêtre d'opportunité. Leur pertinence ne réside pas dans leur capacité à contrôler spontanément l'infection, il est probable qu'ils n'y parviendront pas par eux-mêmes, mais à être inclus dans une stratégie intégrative plus large utilisant le potentiel des LT CD8.

C'est la raison pour laquelle nous avons cherché à amplifier l'expansion et l'acquisition de fonctions effectrices de ces cellules au travers du modèle du « Boosting ». Augmenter le nombre et la fonctionnalité de ces cellules est un objectif important pour la réussite de stratégie telle que le shock and kill. Bien que préliminaires et limitées par le nombre d'échantillons, nos données montrent qu'il est possible de moduler positivement les fonctions effectrices des LT CD8 même après des années de traitement. Sur le peu d'échantillons testés de la cohorte IMMUNOCO, ceux de PS14 ont montré l'expansion et l'acquisition de fonctions effectrices les plus impressionnantes (Marquage représentatif des figures 49–52). Ce résultat est surprenant d'autant plus que cet individu ne possède pas un HLA associé au contrôle (HLA-A*03) et qu'il présente l'un des taux CD4 les plus faibles sur l'ensemble de la cohorte (Annexe 3 Partie 1).

Parmi les molécules testées en tant qu'adjuvant, TLR8L semble induire les meilleures fonctions effectrices. Nous avons déjà montré la capacité de TLR8L à induire des réponses LT CD8 avec une meilleure cytotoxicité, une meilleure prolifération et une meilleure avidité fonctionnelle dans un modèle de priming. Dans cette étude l'acquisition des fonctions effectrices est soutenue par une expression accrue de T-bet dépendant de la cytokine IL-12⁴⁸⁴. Dans le contexte du boosting nous ne pouvons que spéculer qu'un mécanisme similaire soit impliqué. Ceci étant dit, dans notre modèle IL-12 augmente significativement l'expansion des LT CD8 mais pas l'acquisition de fonctions effectrices. De plus nous n'observons pas de modulation de T-bet après ajout de TLR8L ou d'IL-12. Cela suggère qu'il existe des mécanismes additionnels par lesquels TLR8L favorise l'acquisition de fonctions effectrices dans le modèle du boosting. D'une manière importante, TLR8L peut jouer un rôle pertinent dans le contexte de la latence virale. La stimulation de LT CD4 déjà activés par le TCR avec des ligands de TLR8 induit un état « d'hyper-activation » caractérisé par une régulation à la hausse de marqueurs d'activation (CD80, HLA-DR) et une production plus importante de cytokines pro-inflammatoires. Cet état d'activation induit par TLR8L permet une réactivation

partielle du réservoir latent en favorisant la transcription des provirus intégrés ⁴⁸⁵. Une autre étude a confirmé ces résultats en montrant que TLR8L permet de réactiver directement le réservoir de macrophages dérivant de monocytes via la voie MAPK et indirectement le réservoir de LT CD4 via la production de TNF α ⁴⁸⁶. La capacité de TLR8L à simultanément améliorer la fonctionnalité des LT CD8 et réactiver le réservoir en font un candidat intéressant pour une approche « shock and kill ».

Il est avantageux d'utiliser des agonistes de TLR pour plusieurs raisons. D'une part, leur efficacité a déjà été démontrée dans un contexte vaccinal chez l'Homme en tant qu'adjuvant. Les agonistes de TLR3, TLR7 et TLR8 sont notamment impliqués dans plusieurs essais cliniques dans le contexte du cancer de la prostate ou plus récemment dans le développement de vaccins contre SARS-Cov2 ⁴⁸⁷⁻⁴⁹¹. D'autre part, plusieurs agonistes des TLR ont montré leur efficacité dans un contexte d'infection rétrovirale. Les travaux du groupe de Dan Barouch ont montré que l'utilisation combinée de l'agoniste de TLR7 vesatolimod et d'un anticorps neutralisant à large spectre (PGT121) permet de repousser l'apparition du rebond viral chez des macaques rhésus infectés par une souche hybride SIV/VIH (SHIV) (112 jours contre 21 jours pour les animaux contrôles) ⁴⁹²⁻⁴⁹⁴. La charge virale est d'ailleurs restée indétectable pendant plus de 6 mois après l'interruption de traitement chez 5 de ces animaux. Dans cette étude le contrôle de la réplication virale semble être sous la dépendance des NK puisque le temps avant le rebond corrèle avec l'activation de ces cellules, et que le traitement n'induit une réponse LT CD8 spécifique du virus. En revanche une étude similaire faisant intervenir l'utilisation d'anticorps dans le contexte de l'infection à SHIV montre un rôle important des LT CD8 dans le contrôle de l'infection ⁴⁹⁵.

Le succès relatif de ces stratégies met en avant la nécessité de développer des approches combinatoires reposant sur la réponse immunitaire adaptative, mais également les réponses innées et humorales. Pour maximiser l'efficacité de ces approches il sera important de trouver une solution aux barrières actuelles qui empêchent l'éradication du virus, notamment dans le contexte de la réponse LT CD8 :

La variabilité et la diversité virale. La capacité d'acquérir des mutations rapidement est une caractéristique de l'infection à VIH-1 et constitue un frein important pour l'efficacité de la réponse LT CD8. Cet aspect en particulier peut avoir des conséquences directes sur la pertinence des nouveaux clones *in vivo*. Une solution pour limiter l'impact de la diversité

virale serait d'induire et d'améliorer la fonctionnalité des réponses LT CD8 ciblant des épitopes non-mutés importants pour la structure et la capacité répliquative du virus.

Le réservoir. L'existence même du réservoir est un frein majeur à l'éradication du virus. Le développement de LRA capable de réactiver efficacement le réservoir constitue un objectif important pour certaines stratégies visant la guérison fonctionnelle.

La compartimentation de la réplication virale et du réservoir. Le virus se réplique préférentiellement dans des zones inaccessibles aux LT CD8, notamment la zone folliculaire des ganglions lymphatiques. Les LT CD4 des zones folliculaires ont 31 fois plus de chance d'être infectés de manière productive que leur équivalent dans le paracortex ^{465,466,496}. Ces zones sanctuaires pour la réplication virale constituent une barrière majeure à l'éradication du virus. Une solution serait de parvenir à modifier les propriétés migratoires des LT CD8 pour les rediriger vers ces zones d'intérêt. Quelques études ont montré l'existence de LT CD8 CXCR5+ capables de migrer vers les follicules et contrôler la réplication virale sur place. Ces observations ont été faites dans le contexte du contrôle naturel de l'infection, aussi bien chez l'Homme que chez le singe ^{497,498}. Compte tenu de la contribution des LT CD4 folliculaires des centres germinatifs au réservoir, il est crucial de développer des stratégies visant à promouvoir la migration des LT CD8 vers ces zones sanctuaires.

L'épuisement des LT CD8. L'épuisement progressif des LT CD8 pendant l'infection à VIH compromet la réussite de toutes les stratégies qui dépendent de la fonctionnalité de ces cellules. Les stratégies actuelles pour limiter ce phénomène reposent sur la reprogrammation de ces cellules pour les doter d'un potentiel de stemness, ou sur l'utilisation d'inhibiteurs de points de contrôle immunitaire destinés à limiter l'épuisement et rétablir les fonctions des LT CD8. Nos résultats indiquent que, dans certains cas, de nouvelles réponses LT CD8 avec des caractéristiques de stemness peuvent être générées chez des individus traités depuis des années malgré un vieillissement immunitaire marqué. Cette observation offre l'opportunité d'inclure ces cellules dans une stratégie plus large cherchant à diminuer la taille du réservoir et éventuellement, à terme, permettre la guérison fonctionnelle des individus infectés par VIH-1.

CONCLUSION

En conclusion, dans ce travail de thèse nous avons cherché à évaluer le potentiel de la réponse LT CD8 chez des individus infectés par VIH-1 après des années de traitement efficace. Les LT CD8 jouent un rôle important dans le contrôle de l'infection à VIH-1 et leurs propriétés fonctionnelles corrèlent directement avec une progression plus lente de la maladie. Cependant la majorité des individus infectés par VIH-1 voient la fonctionnalité de leur réponse LT CD8 diminuer graduellement jusqu'à perdre la capacité de contrôler efficacement la réplication virale. L'initiation du traitement permet une restauration partielle de la fonctionnalité des LT CD8, mais jamais au niveau d'individus séronégatifs. De plus, l'épidémie a commencé il y a plus de 40 ans et la plupart des individus infectés par le virus commencent à vieillir significativement. Le déclin de l'immunocompétence associé à l'âge, aussi appelé immunosénescence, est une limite supplémentaire à l'induction de réponses LT CD8 fonctionnelles. Pour toutes ces raisons il est important d'évaluer si le traitement à très long terme des individus infectés par VIH-1 a permis de préserver le potentiel des LT CD8 pour le contrôle de la réplication virale, et donc, leur pertinence dans certaines stratégies thérapeutiques comme la stratégie shock and kill.

Après des années d'infections nous observons que les LT CD8 spécifiques du virus montrent au niveau phénotypique et transcriptomique des caractéristiques associées à la différenciation précoce et à la stemness. Ce profil transcriptomique correspond également à celui observé chez des individus contrôleurs, capable de contrôler la réplication virale en l'absence de traitement. Ces modifications phénotypiques et transcriptomiques sont accompagnées de l'apparition de nouveaux clones présentant un potentiel supérieur pour le contrôle de la réplication virale. Enfin, nous montrons que l'utilisation de certains adjuvants (TRL8L notamment) permet d'induire des réponses LT CD8 hautement fonctionnelles et de magnitude importante, même après des années de traitement. Ces observations suggèrent deux choses : d'une part le traitement à long terme a permis de maintenir un certain potentiel pour le contrôle de la réplication virale. C'est une observation encourageante pour les individus traités efficacement depuis plusieurs décennies. D'autre part, l'apparition de nouveaux clones présentant des caractéristiques associées à la stemness suggèrent une capacité de résilience du système immunitaire, même chez des individus montrant des signes marqués de vieillissement immunitaire. Cette observation a des implications qui dépassent le simple cadre de l'infection à VIH-1. L'existence de ces cellules offrent l'opportunité de les inclure dans des stratégies intégratives plus larges visant à diminuer la taille du réservoir et permettre ainsi la guérison fonctionnelle des individus infectés par VIH-1.

RÉFÉRENCES

1. Pneumocystis Pneumonia --- Los Angeles.
https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/june_5.htm.
2. Barré-Sinoussi, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868–871 (1983).
3. Global HIV & AIDS statistics — Fact sheet. <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>.
4. Clavel, F. *et al.* Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**, 343–346 (1986).
5. Daniel, M. D. *et al.* Isolation of T-Cell Tropic HTLV-III-Like Retrovirus from Macaques. *Science* **228**, 1201–1204 (1985).
6. Kanki, P. J. *et al.* Serologic identification and characterization of a macaque T-lymphotropic retrovirus closely related to HTLV-III. *Science* **228**, 1199–1201 (1985).
7. Kannagi, M., Yetz, J. M. & Letvin, N. L. In vitro growth characteristics of simian T-lymphotropic virus type III. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 7053–7057 (1985).
8. Huet, T., Cheynier, R., Meyerhans, A., Roelants, G. & Wain-Hobson, S. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* **345**, 356–359 (1990).
9. Hirsch, V. M., Olmsted, R. A., Murphey-Corb, M., Purcell, R. H. & Johnson, P. R. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* **339**, 389–392 (1989).
10. Sharp, P. M. & Hahn, B. H. Origins of HIV and the AIDS Pandemic. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **1**, a006841 (2011).
11. Vallari, A. *et al.* Four new HIV-1 group N isolates from Cameroon: Prevalence continues to be low. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **26**, 109–115 (2010).
12. Plantier, J.-C. *et al.* A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med.* **15**, 871–872 (2009).
13. Vallari, A. *et al.* Confirmation of Putative HIV-1 Group P in Cameroon. *J. Virol.* **85**, 1403–1407 (2011).
14. Taylor, B. S., Sobieszczyk, M. E., McCutchan, F. E. & Hammer, S. M. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1590–1602 (2008).
15. Geretti, A. M. HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **19**, 1–7 (2006).
16. Pieniazek, D. *et al.* Predominance of human immunodeficiency virus type 2 subtype B in Abidjan, Ivory Coast. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **15**, 603–608 (1999).
17. Briggs, J. A. G., Wilk, T., Welker, R., Kräusslich, H.-G. & Fuller, S. D. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO J.* **22**, 1707–1715 (2003).

18. Zhu, P. *et al.* Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* **441**, 847–852 (2006).
19. van Heuvel, Y., Schatz, S., Rosengarten, J. F. & Stitz, J. Infectious RNA: Human Immunodeficiency Virus (HIV) Biology, Therapeutic Intervention, and the Quest for a Vaccine. *Toxins* **14**, 138 (2022).
20. Greene, W. C. & Peterlin, B. M. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat. Med.* **8**, 673–680 (2002).
21. Ferguson, M. R., Rojo, D. R., von Lindern, J. J. & O'Brien, W. A. HIV-1 replication cycle. *Clin. Lab. Med.* **22**, 611–635 (2002).
22. Hladik, F. & McElrath, M. J. Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 447–457 (2008).
23. Coffin, J. & Swanstrom, R. HIV pathogenesis: dynamics and genetics of viral populations and infected cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **3**, a012526 (2013).
24. Belyakov, I. M. & Berzofsky, J. A. Immunobiology of Mucosal HIV Infection and the Basis for Development of a New Generation of Mucosal AIDS Vaccines. *Immunity* **20**, 247–253 (2004).
25. Veazey, R. S. *et al.* Dynamics of CCR5 expression by CD4(+) T cells in lymphoid tissues during simian immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* **74**, 11001–11007 (2000).
26. Kunkel, E. J. *et al.* Expression of the chemokine receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by human tissue-infiltrating lymphocytes. *Am. J. Pathol.* **160**, 347–355 (2002).
27. Meng, G. *et al.* Lamina Propria Lymphocytes, Not Macrophages, Express CCR5 and CXCR4 and Are the Likely Target Cell for Human Immunodeficiency Virus Type 1 in the Intestinal Mucosa. *J. Infect. Dis.* **182**, 785–791 (2000).
28. Pope, M., Gezelter, S., Gallo, N., Hoffman, L. & Steinman, R. M. Low levels of HIV-1 infection in cutaneous dendritic cells promote extensive viral replication upon binding to memory CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* **182**, 2045–2056 (1995).
29. Niedecken, H., Lutz, G., Bauer, R. & Kreysel, H. W. Langerhans cell as primary target and vehicle for transmission of HIV. *Lancet Lond. Engl.* **2**, 519–520 (1987).
30. Veazey, R. S. *et al.* Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* **280**, 427–431 (1998).
31. Brenchley, J. M. *et al.* CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* **200**, 749–759 (2004).
32. Guy-Grand, D. & Vassalli, P. Gut intraepithelial T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* **5**, 247–252 (1993).

33. Douek, D. C., Picker, L. J. & Koup, R. A. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 265–304 (2003).
34. Unutmaz, D., KewalRamani, V. N., Marmon, S. & Littman, D. R. Cytokine signals are sufficient for HIV-1 infection of resting human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **189**, 1735–1746 (1999).
35. Markowitz, M. *et al.* A novel antiviral intervention results in more accurate assessment of human immunodeficiency virus type 1 replication dynamics and T-cell decay in vivo. *J. Virol.* **77**, 5037–5038 (2003).
36. McMichael, A. J., Borrow, P., Tomaras, G. D., Goonetilleke, N. & Haynes, B. F. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 11–23 (2010).
37. Lifson, J. D. *et al.* Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. *Nature* **323**, 725–728 (1986).
38. Cohen, M. S., Shaw, G. M., McMichael, A. J. & Haynes, B. F. Acute HIV-1 Infection. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1943–1954 (2011).
39. Daar, E. S., Pilcher, C. D. & Hecht, F. M. Clinical presentation and diagnosis of primary HIV-1 infection. *Curr. Opin. HIV AIDS* **3**, 10–15 (2008).
40. Piatak, M. *et al.* High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* **259**, 1749–1754 (1993).
41. Clark, S. J. *et al.* High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* **324**, 954–960 (1991).
42. Daar, E. S., Moudgil, T., Meyer, R. D. & Ho, D. D. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* **324**, 961–964 (1991).
43. Price, D. A. *et al.* Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 1890–1895 (1997).
44. Koup, R. A. *et al.* Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J. Virol.* **68**, 4650–4655 (1994).
45. Moir, S., Chun, T.-W. & Fauci, A. S. Pathogenic Mechanisms of HIV Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **6**, 223–248 (2011).
46. Hazenberg, M. D., Hamann, D., Schuitemaker, H. & Miedema, F. T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4+ T cells go out of stock. *Nat. Immunol.* **1**, 285–289 (2000).
47. Paiardini, M. & Müller-Trutwin, M. HIV-associated chronic immune activation. *Immunol. Rev.* **254**, 78–101 (2013).

48. Giorgi, J. V. *et al.* Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J. Infect. Dis.* **179**, 859–870 (1999).
49. Liu, Z. *et al.* Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirology Off. Publ. Int. Retrovirology Assoc.* **16**, 83–92 (1997).
50. Alimonti, J. B., Ball, T. B. & Fowke, K. R. Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *J. Gen. Virol.* **84**, 1649–1661 (2003).
51. Appay, V. & Sauce, D. Assessing immune aging in HIV-infected patients. *Virulence* **8**, 529–538 (2017).
52. Mondor, I., Ugolini, S. & Sattentau, Q. J. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Attachment to HeLa CD4 Cells Is CD4 Independent and gp120 Dependent and Requires Cell Surface Heparans. *J. Virol.* **72**, 3623–3634 (1998).
53. Arthos, J. *et al.* HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat. Immunol.* **9**, 301–309 (2008).
54. Geijtenbeek, T. B. *et al.* DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**, 587–597 (2000).
55. Orloff, G. M., Orloff, S. L., Kennedy, M. S., Maddon, P. J. & McDougal, J. S. Penetration of CD4 T cells by HIV-1. The CD4 receptor does not internalize with HIV, and CD4-related signal transduction events are not required for entry. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **146**, 2578–2587 (1991).
56. Maddon, P. J. *et al.* The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* **47**, 333–348 (1986).
57. McDougal, J. S. *et al.* Binding of the human retrovirus HTLV-III/LAV/ARV/HIV to the CD4 (T4) molecule: conformation dependence, epitope mapping, antibody inhibition, and potential for idiotypic mimicry. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **137**, 2937–2944 (1986).
58. Wilen, C. B., Tilton, J. C. & Doms, R. W. HIV: Cell Binding and Entry. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006866 (2012).
59. Chen, B. Molecular Mechanism of HIV-1 Entry. *Trends Microbiol.* **27**, 878–891 (2019).
60. Xiao, T., Cai, Y. & Chen, B. HIV-1 Entry and Membrane Fusion Inhibitors. *Viruses* **13**, 735 (2021).

61. Butler, S. L., Hansen, M. S. & Bushman, F. D. A quantitative assay for HIV DNA integration in vivo. *Nat. Med.* **7**, 631–634 (2001).
62. Hu, W.-S. & Hughes, S. H. HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006882 (2012).
63. Lusic, M. & Siliciano, R. F. Nuclear landscape of HIV-1 infection and integration. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 69–82 (2017).
64. Engelman, A. N. & Singh, P. K. Cellular and molecular mechanisms of HIV-1 integration targeting. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **75**, 2491–2507 (2018).
65. Smith, S. J. *et al.* Integrase Strand Transfer Inhibitors Are Effective Anti-HIV Drugs. *Viruses* **13**, 205 (2021).
66. Engelman, A., Mizuuchi, K. & Craigie, R. HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell* **67**, 1211–1221 (1991).
67. Freed, E. O. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 484–496 (2015).
68. Perelson, A. S. *et al.* Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature* **387**, 188–191 (1997).
69. Chun, T. W. *et al.* Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* **387**, 183–188 (1997).
70. Finzi, D. *et al.* Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* **278**, 1295–1300 (1997).
71. Wong, J. K. *et al.* Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* **278**, 1291–1295 (1997).
72. Finzi, D. *et al.* Latent infection of CD4⁺ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat. Med.* **5**, 512–517 (1999).
73. Vanhamel, J., Bruggemans, A. & Debyser, Z. Establishment of latent HIV-1 reservoirs: what do we really know? *J. Virus Erad.* **5**, 3–9.
74. Buzon, M. J. *et al.* HIV-1 persistence in CD4⁺ T cells with stem cell-like properties. *Nat. Med.* **20**, 139–142 (2014).
75. Chomont, N. *et al.* HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat. Med.* **15**, 893–900 (2009).
76. Brenchley, J. M. *et al.* T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis. *J. Virol.* **78**, 1160–1168 (2004).
77. Soriano-Sarabia, N. *et al.* Quantitation of replication-competent HIV-1 in populations of resting CD4⁺ T cells. *J. Virol.* **88**, 14070–14077 (2014).

78. Schwendemann, J., Choi, C., Schirmacher, V. & Beckhove, P. Dynamic differentiation of activated human peripheral blood CD8⁺ and CD4⁺ effector memory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**, 1433–1439 (2005).
79. Swingler, S., Mann, A. M., Zhou, J., Swingler, C. & Stevenson, M. Apoptotic Killing of HIV-1–Infected Macrophages Is Subverted by the Viral Envelope Glycoprotein. *PLOS Pathog.* **3**, e134 (2007).
80. Epelman, S., Lavine, K. J. & Randolph, G. J. Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity* **41**, 21–35 (2014).
81. Kruize, Z. & Kootstra, N. A. The Role of Macrophages in HIV-1 Persistence and Pathogenesis. *Front. Microbiol.* **10**, (2019).
82. Ganor, Y. *et al.* HIV-1 reservoirs in urethral macrophages of patients under suppressive antiretroviral therapy. *Nat. Microbiol.* **4**, 633–644 (2019).
83. Williams, K. C. *et al.* Perivascular macrophages are the primary cell type productively infected by simian immunodeficiency virus in the brains of macaques: implications for the neuropathogenesis of AIDS. *J. Exp. Med.* **193**, 905–915 (2001).
84. Koenig, S. *et al.* Detection of AIDS Virus in Macrophages in Brain Tissue from AIDS Patients with Encephalopathy. *Science* **233**, 1089–1093 (1986).
85. McKinnon, L. R. & Kaul, R. Quality and quantity: mucosal CD4⁺ T cells and HIV susceptibility. *Curr. Opin. HIV AIDS* **7**, 195–202 (2012).
86. Pierson, T., McArthur, J. & Siliciano, R. F. Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 665–708 (2000).
87. Schröder, A. R. W. *et al.* HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**, 521–529 (2002).
88. Wang, G. P., Ciuffi, A., Leipzig, J., Berry, C. C. & Bushman, F. D. HIV integration site selection: analysis by massively parallel pyrosequencing reveals association with epigenetic modifications. *Genome Res.* **17**, 1186–1194 (2007).
89. Han, Y. *et al.* Resting CD4⁺ T cells from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals carry integrated HIV-1 genomes within actively transcribed host genes. *J. Virol.* **78**, 6122–6133 (2004).
90. Albanese, A., Arosio, D., Terreni, M. & Cereseto, A. HIV-1 Pre-Integration Complexes Selectively Target Decondensed Chromatin in the Nuclear Periphery. *PLOS ONE* **3**, e2413 (2008).
91. Chougui, G. *et al.* HIV-2/SIV viral protein X counteracts HUSH repressor complex. *Nat. Microbiol.* **3**, 891–897 (2018).

92. Matkovic, R. *et al.* TASOR epigenetic repressor cooperates with a CNOT1 RNA degradation pathway to repress HIV. *Nat. Commun.* **13**, 66 (2022).
93. Cohn, L. B. *et al.* HIV-1 integration landscape during latent and active infection. *Cell* **160**, 420–432 (2015).
94. Wagner, T. A. *et al.* Proliferation of cells with HIV integrated into cancer genes contributes to persistent infection. *Science* **345**, 570–573 (2014).
95. Maldarelli, F. *et al.* HIV latency. Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells. *Science* **345**, 179–183 (2014).
96. Simonetti, F. R. *et al.* Clonally expanded CD4⁺ T cells can produce infectious HIV-1 in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 1883–1888 (2016).
97. Jordan, A., Defechereux, P. & Verdin, E. The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *EMBO J.* **20**, 1726–1738 (2001).
98. Sherrill-Mix, S. *et al.* HIV latency and integration site placement in five cell-based models. *Retrovirology* **10**, 90 (2013).
99. Verhoef, K., Koper, M. & Berkhout, B. Determination of the minimal amount of Tat activity required for human immunodeficiency virus type 1 replication. *Virology* **237**, 228–236 (1997).
100. Chun, T. W. *et al.* Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 8869–8873 (1998).
101. Colby, D. J. *et al.* Rapid HIV RNA rebound after antiretroviral treatment interruption in persons durably suppressed in Fiebig I acute HIV infection. *Nat. Med.* **24**, 923–926 (2018).
102. Whitney, J. B. *et al.* Rapid seeding of the viral reservoir prior to SIV viraemia in rhesus monkeys. *Nature* **512**, 74–77 (2014).
103. Bitnun, A. *et al.* Early initiation of combination antiretroviral therapy in HIV-1-infected newborns can achieve sustained virologic suppression with low frequency of CD4⁺ T cells carrying HIV in peripheral blood. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **59**, 1012–1019 (2014).
104. Giacomet, V. *et al.* No cure of HIV infection in a child despite early treatment and apparent viral clearance. *Lancet Lond. Engl.* **384**, 1320 (2014).
105. Principaux repères sur le VIH/sida. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>.
106. Deeks, S. G., Lewin, S. R. & Havlir, D. V. The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. *Lancet Lond. Engl.* **382**, 1525–1533 (2013).

- 107.** Henrich, T. J. & Kuritzkes, D. R. HIV-1 entry inhibitors: recent development and clinical use. *Curr. Opin. Virol.* **3**, 51–57 (2013).
- 108.** Nettles, R. E. *et al.* Pharmacodynamics, safety, and pharmacokinetics of BMS-663068, an oral HIV-1 attachment inhibitor in HIV-1-infected subjects. *J. Infect. Dis.* **206**, 1002–1011 (2012).
- 109.** Burkly, L. C. *et al.* Inhibition of HIV infection by a novel CD4 domain 2-specific monoclonal antibody. Dissecting the basis for its inhibitory effect on HIV-induced cell fusion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **149**, 1779–1787 (1992).
- 110.** Dorr, P. *et al.* Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 4721–4732 (2005).
- 111.** Nichols, W. G. *et al.* Hepatotoxicity Observed in Clinical Trials of Atravirine (GW873140). *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 858–865 (2008).
- 112.** Lenz, J. C. C. & Rockstroh, J. K. Vicriviroc, a new CC-chemokine receptor 5 inhibitor for treatment of HIV: properties, promises and challenges. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **6**, 1139–1150 (2010).
- 113.** Doranz, B. J. *et al.* A small-molecule inhibitor directed against the chemokine receptor CXCR4 prevents its use as an HIV-1 coreceptor. *J. Exp. Med.* **186**, 1395–1400 (1997).
- 114.** Hatse, S. *et al.* AMD3465, a monomacrocyclic CXCR4 antagonist and potent HIV entry inhibitor. *Biochem. Pharmacol.* **70**, 752–761 (2005).
- 115.** Stone, N. D. *et al.* Multiple-dose escalation study of the safety, pharmacokinetics, and biologic activity of oral AMD070, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in human subjects. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 2351–2358 (2007).
- 116.** Murakami, T. *et al.* The novel CXCR4 antagonist KRH-3955 is an orally bioavailable and extremely potent inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 infection: comparative studies with AMD3100. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 2940–2948 (2009).
- 117.** Wild, C. T., Shugars, D. C., Greenwell, T. K., McDanal, C. B. & Matthews, T. J. Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 9770–9774 (1994).
- 118.** Lazzarin, A. *et al.* Efficacy of enfuvirtide in patients infected with drug-resistant HIV-1 in Europe and Australia. *N. Engl. J. Med.* **348**, 2186–2195 (2003).
- 119.** Hazuda, D. *et al.* Equivalent inhibition of half-site and full-site retroviral strand transfer reactions by structurally diverse compounds. *J. Virol.* **71**, 807–811 (1997).

- 120.** Hsu, D. C., Sereti, I. & Ananworanich, J. Serious Non-AIDS events: Immunopathogenesis and interventional strategies. *AIDS Res. Ther.* **10**, 29 (2013).
- 121.** Korber, B. *et al.* Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *Br. Med. Bull.* **58**, 19–42 (2001).
- 122.** Johnston, M. I. & Fauci, A. S. HIV Vaccine Development — Improving on Natural Immunity. *N. Engl. J. Med.* **365**, 873–875 (2011).
- 123.** Nabel, G. J. & Fauci, A. S. Induction of unnatural immunity: prospects for a broadly protective universal influenza vaccine. *Nat. Med.* **16**, 1389–1391 (2010).
- 124.** Hütter, G. *et al.* Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **360**, 692–698 (2009).
- 125.** Henrich, T. J. *et al.* Long-term reduction in peripheral blood HIV type 1 reservoirs following reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *J. Infect. Dis.* **207**, 1694–1702 (2013).
- 126.** Persaud, D. *et al.* Absence of detectable HIV-1 viremia after treatment cessation in an infant. *N. Engl. J. Med.* **369**, 1828–1835 (2013).
- 127.** Davenport, M. P. *et al.* Functional cure of HIV: the scale of the challenge. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 45–54 (2019).
- 128.** Strain, M. C. *et al.* Effect of treatment, during primary infection, on establishment and clearance of cellular reservoirs of HIV-1. *J. Infect. Dis.* **191**, 1410–1418 (2005).
- 129.** Hocqueloux, L. *et al.* Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key to achieving both low HIV reservoirs and normal T cell counts. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 1169–1178 (2013).
- 130.** Jain, V. *et al.* Antiretroviral therapy initiated within 6 months of HIV infection is associated with lower T-cell activation and smaller HIV reservoir size. *J. Infect. Dis.* **208**, 1202–1211 (2013).
- 131.** Wilson, E. M. P. & Sereti, I. Immune restoration after antiretroviral therapy: the pitfalls of hasty or incomplete repairs. *Immunol. Rev.* **254**, 343–354 (2013).
- 132.** Hamer, D. H. Can HIV be Cured? Mechanisms of HIV persistence and strategies to combat it. *Curr. HIV Res.* **2**, 99–111 (2004).
- 133.** Kim, Y., Anderson, J. L. & Lewin, S. R. Getting the “kill” into “shock and kill”: strategies to eliminate latent HIV. *Cell Host Microbe* **23**, 14–26 (2018).
- 134.** Archin, N. M. *et al.* Interval dosing with the HDAC inhibitor vorinostat effectively reverses HIV latency. *J. Clin. Invest.* **127**, 3126–3135 (2017).
- 135.** Archin, N. M. *et al.* Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature* **487**, 482–485 (2012).

- 136.** Rasmussen, T. A. *et al.* Panobinostat, a histone deacetylase inhibitor, for latent-virus reactivation in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy: a phase 1/2, single group, clinical trial. *Lancet HIV* **1**, e13-21 (2014).
- 137.** Søgaaard, O. S. *et al.* The Depsipeptide Romidepsin Reverses HIV-1 Latency In Vivo. *PLoS Pathog.* **11**, e1005142 (2015).
- 138.** Pandeló José, D. *et al.* Reactivation of latent HIV-1 by new semi-synthetic ingenol esters. *Virology* **462–463**, 328–339 (2014).
- 139.** Abreu, C. M. *et al.* Dual Role of Novel Ingenol Derivatives from *Euphorbia tirucalli* in HIV Replication: Inhibition of De Novo Infection and Activation of Viral LTR. *PLOS ONE* **9**, e97257 (2014).
- 140.** Jiang, G. *et al.* Synergistic Reactivation of Latent HIV Expression by Ingenol-3-Angelate, PEP005, Targeted NF- κ B Signaling in Combination with JQ1 Induced p-TEFb Activation. *PLOS Pathog.* **11**, e1005066 (2015).
- 141.** Gama, L. *et al.* Reactivation of simian immunodeficiency virus reservoirs in the brain of virally suppressed macaques. *AIDS Lond. Engl.* **31**, 5–14 (2017).
- 142.** Ait-Ammar, A. *et al.* Current Status of Latency Reversing Agents Facing the Heterogeneity of HIV-1 Cellular and Tissue Reservoirs. *Front. Microbiol.* **10**, (2020).
- 143.** Walker-Sperling, V. E., Pohlmeyer, C. W., Tarwater, P. M. & Blankson, J. N. The Effect of Latency Reversal Agents on Primary CD8⁺ T Cells: Implications for Shock and Kill Strategies for Human Immunodeficiency Virus Eradication. *EBioMedicine* **8**, 217–229 (2016).
- 144.** Jensen, S. S. *et al.* Initiation of Antiretroviral Therapy (ART) at Different Stages of HIV-1 Disease Is Not Associated with the Proportion of Exhausted CD8⁺ T Cells. *PloS One* **10**, e0139573 (2015).
- 145.** Hersperger, A. R. *et al.* Perforin expression directly ex vivo by HIV-specific CD8 T-cells is a correlate of HIV elite control. *PLoS Pathog.* **6**, e1000917 (2010).
- 146.** Betts, M. R. *et al.* HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8⁺ T cells. *Blood* **107**, 4781–4789 (2006).
- 147.** Shan, L. *et al.* Stimulation of HIV-1-Specific Cytolytic T Lymphocytes Facilitates Elimination of Latent Viral Reservoir after Virus Reactivation. *Immunity* **36**, 491–501 (2012).
- 148.** Vansant, G., Bruggemans, A., Janssens, J. & Debyser, Z. Block-And-Lock Strategies to Cure HIV Infection. *Viruses* **12**, 84 (2020).
- 149.** Darcis, G., Van Driessche, B. & Van Lint, C. HIV Latency: Should We Shock or Lock? *Trends Immunol.* **38**, 217–228 (2017).

150. Mousseau, G. *et al.* The Tat Inhibitor Didehydro-Cortistatin A Prevents HIV-1 Reactivation from Latency. *mBio* **6**, e00465 (2015).
151. Mousseau, G. *et al.* An analog of the natural steroidal alkaloid cortistatin A potently suppresses Tat-dependent HIV transcription. *Cell Host Microbe* **12**, 97–108 (2012).
152. Joshi, P., Maidji, E. & Stoddart, C. A. Inhibition of Heat Shock Protein 90 Prevents HIV Rebound. *J. Biol. Chem.* **291**, 10332–10346 (2016).
153. Kessing, C. F. *et al.* In Vivo Suppression of HIV Rebound by Didehydro-Cortistatin A, a ‘Block-and-Lock’ Strategy for HIV-1 Treatment. *Cell Rep.* **21**, 600–611 (2017).
154. Barker, E. *et al.* Virological and immunological features of long-term human immunodeficiency virus-infected individuals who have remained asymptomatic compared with those who have progressed to acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* **92**, 3105–3114 (1998).
155. Martinez, V. *et al.* Combination of HIV-1-specific CD4 Th1 cell responses and IgG2 antibodies is the best predictor for persistence of long-term nonprogression. *J. Infect. Dis.* **191**, 2053–2063 (2005).
156. Cao, Y., Qin, L., Zhang, L., Safrit, J. & Ho, D. D. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* **332**, 201–208 (1995).
157. Muñoz, A. *et al.* Long-term survivors with HIV-1 infection: incubation period and longitudinal patterns of CD4+ lymphocytes. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirology Off. Publ. Int. Retrovirology Assoc.* **8**, 496–505 (1995).
158. Lefrère, J. J. *et al.* Even individuals considered as long-term nonprogressors show biological signs of progression after 10 years of human immunodeficiency virus infection. *Blood* **90**, 1133–1140 (1997).
159. Okulicz, J. F. *et al.* Clinical outcomes of elite controllers, viremic controllers, and long-term nonprogressors in the US Department of Defense HIV natural history study. *J. Infect. Dis.* **200**, 1714–1723 (2009).
160. Gonzalo-Gil, E., Ikediobi, U. & Sutton, R. E. Mechanisms of Virologic Control and Clinical Characteristics of HIV+ Elite/Viremic Controllers. *Yale J. Biol. Med.* **90**, 245–259 (2017).
161. Okulicz, J. F. & Lambotte, O. Epidemiology and clinical characteristics of elite controllers. *Curr. Opin. HIV AIDS* **6**, 163–168 (2011).
162. Lambotte, O. *et al.* HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **41**, 1053–1056 (2005).

- 163.** Deeks, S. G. & Walker, B. D. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity* **27**, 406–416 (2007).
- 164.** O’Connell, K. A., Bailey, J. R. & Blankson, J. N. Elucidating the elite: mechanisms of control in HIV-1 infection. *Trends Pharmacol. Sci.* **30**, 631–637 (2009).
- 165.** Blankson, J. N. *et al.* Isolation and Characterization of Replication-Competent Human Immunodeficiency Virus Type 1 from a Subset of Elite Suppressors. *J. Virol.* **81**, 2508–2518 (2007).
- 166.** Salgado, M. *et al.* HLA-B*57 elite suppressor and chronic progressor HIV-1 isolates replicate vigorously and cause CD4+ T cell depletion in humanized BLT mice. *J. Virol.* **88**, 3340–3352 (2014).
- 167.** Bailey, J. R. *et al.* Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 from a Patient Who Developed AIDS to an Elite Suppressor. *J. Virol.* **82**, 7395–7410 (2008).
- 168.** Buckheit, R. W. *et al.* Host factors dictate control of viral replication in two HIV-1 controller/chronic progressor transmission pairs. *Nat. Commun.* **3**, 716 (2012).
- 169.** Mens, H. *et al.* HIV-1 continues to replicate and evolve in patients with natural control of HIV infection. *J. Virol.* **84**, 12971–12981 (2010).
- 170.** Morley, D. *et al.* Rapid development of HIV elite control in a patient with acute infection. *BMC Infect. Dis.* **19**, 815 (2019).
- 171.** Pereyra, F. *et al.* Persistent low level viremia in HIV-1 elite controllers and relationship to immunologic parameters. *J. Infect. Dis.* **200**, 984–990 (2009).
- 172.** Palmer, S. *et al.* New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4531–4536 (2003).
- 173.** Boufassa, F. *et al.* CD4 dynamics over a 15 year-period among HIV controllers enrolled in the ANRS French observatory. *PLoS One* **6**, e18726 (2011).
- 174.** Rosás-Umbert, M. *et al.* Mechanisms of Abrupt Loss of Virus Control in a Cohort of Previous HIV Controllers. *J. Virol.* **93**, e01436-18 (2019).
- 175.** Etemad, B., Esmaeilzadeh, E. & Li, J. Z. Learning From the Exceptions: HIV Remission in Post-treatment Controllers. *Front. Immunol.* **10**, 1749 (2019).
- 176.** Sáez-Cirión, A. *et al.* Post-Treatment HIV-1 Controllers with a Long-Term Virological Remission after the Interruption of Early Initiated Antiretroviral Therapy ANRS VISCONTI Study. *PLOS Pathog.* **9**, e1003211 (2013).
- 177.** Hocqueloux, L. *et al.* Long-term immunovirologic control following antiretroviral therapy interruption in patients treated at the time of primary HIV-1 infection. *AIDS Lond. Engl.* **24**, 1598–1601 (2010).

- 178.** Goujard, C. *et al.* HIV-1 control after transient antiretroviral treatment initiated in primary infection: role of patient characteristics and effect of therapy. *Antivir. Ther.* **17**, 1001–1009 (2012).
- 179.** Goujard, C. *et al.* Spontaneous Control of Viral Replication during Primary HIV Infection: When Is ‘HIV Controller’ Status Established? *Clin. Infect. Dis.* **49**, 982–986 (2009).
- 180.** Carrington, M. *et al.* HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science* **283**, 1748–1752 (1999).
- 181.** Tang, J. *et al.* HLA class I homozygosity accelerates disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **15**, 317–324 (1999).
- 182.** Goulder, P. J. *et al.* Novel, cross-restricted, conserved, and immunodominant cytotoxic T lymphocyte epitopes in slow progressors in HIV type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **12**, 1691–1698 (1996).
- 183.** Kaslow, R. A. *et al.* Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat. Med.* **2**, 405–411 (1996).
- 184.** Goulder, P. J. R. & Walker, B. D. HIV and HLA Class I: an evolving relationship. *Immunity* **37**, 426–440 (2012).
- 185.** Emu, B. *et al.* HLA class I-restricted T-cell responses may contribute to the control of human immunodeficiency virus infection, but such responses are not always necessary for long-term virus control. *J. Virol.* **82**, 5398–5407 (2008).
- 186.** Keet, I. P. *et al.* Consistent associations of HLA class I and II and transporter gene products with progression of human immunodeficiency virus type 1 infection in homosexual men. *J. Infect. Dis.* **180**, 299–309 (1999).
- 187.** Chen, Y. *et al.* Influence of HLA alleles on the rate of progression of vertically transmitted HIV infection in children: association of several HLA-DR13 alleles with long-term survivorship and the potential association of HLA-A*2301 with rapid progression to AIDS. Long-Term Survivor Study. *Hum. Immunol.* **55**, 154–162 (1997).
- 188.** Ranasinghe, S. *et al.* Association of HLA-DRB1-restricted CD4⁺ T cell responses with HIV immune control. *Nat. Med.* **19**, 930–933 (2013).
- 189.** Chatterjee, K. Host genetic factors in susceptibility to HIV-1 infection and progression to AIDS. *J. Genet.* **89**, 109–116 (2010).
- 190.** Ioannidis, J. P. *et al.* Effects of CCR5-Delta32, CCR2-64I, and SDF-1 3’A alleles on HIV-1 disease progression: An international meta-analysis of individual-patient data. *Ann. Intern. Med.* **135**, 782–795 (2001).
- 191.** Smith, M. W. *et al.* Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study

- (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study. *Science* **277**, 959–965 (1997).
- 192.** Liu, H. *et al.* Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 4581–4585 (1999).
- 193.** Winkler, C. *et al.* Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC). *Science* **279**, 389–393 (1998).
- 194.** Malim, M. H. & Bieniasz, P. D. HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006940 (2012).
- 195.** Abdel-Mohsen, M. *et al.* Expression profile of host restriction factors in HIV-1 elite controllers. *Retrovirology* **10**, 106 (2013).
- 196.** Sáez-Cirión, A. *et al.* Restriction of HIV-1 replication in macrophages and CD4+ T cells from HIV controllers. *Blood* **118**, 955–964 (2011).
- 197.** Jacobs, E. S. *et al.* Cytokines Elevated in HIV Elite Controllers Reduce HIV Replication In Vitro and Modulate HIV Restriction Factor Expression. *J. Virol.* **91**, e02051-16 (2017).
- 198.** Hamimi, C. *et al.* Dendritic Cells from HIV Controllers Have Low Susceptibility to HIV-1 Infection In Vitro but High Capacity to Capture HIV-1 Particles. *PloS One* **11**, e0160251 (2016).
- 199.** Lahouassa, H. *et al.* SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat. Immunol.* **13**, 223–228 (2012).
- 200.** Ryoo, J. *et al.* The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction. *Nat. Med.* **20**, 936–941 (2014).
- 201.** Goujon, C. *et al.* SIVSM/HIV-2 Vpx proteins promote retroviral escape from a proteasome-dependent restriction pathway present in human dendritic cells. *Retrovirology* **4**, 2 (2007).
- 202.** Su, B. *et al.* Dendritic cell-lymphocyte cross talk downregulates host restriction factor SAMHD1 and stimulates HIV-1 replication in dendritic cells. *J. Virol.* **88**, 5109–5121 (2014).
- 203.** Martin-Gayo, E. & Yu, X. G. Dendritic Cell Immune Responses in HIV-1 Controllers. *Curr. HIV/AIDS Rep.* **14**, 1–7 (2017).
- 204.** Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* **9**, 503–510 (2008).

- 205.** Biron, C. A., Byron, K. S. & Sullivan, J. L. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N. Engl. J. Med.* **320**, 1731–1735 (1989).
- 206.** Orange, J. S. Natural killer cell deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, 515–526 (2013).
- 207.** Altfeld, M., Fadda, L., Frleta, D. & Bhardwaj, N. DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 176–186 (2011).
- 208.** O’Connell, K. A., Han, Y., Williams, T. M., Siliciano, R. F. & Blankson, J. N. Role of natural killer cells in a cohort of elite suppressors: low frequency of the protective KIR3DS1 allele and limited inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in vitro. *J. Virol.* **83**, 5028–5034 (2009).
- 209.** Martin, M. P. *et al.* Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat. Genet.* **31**, 429–434 (2002).
- 210.** Alter, G. *et al.* Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. *J. Exp. Med.* **204**, 3027–3036 (2007).
- 211.** Berger, C. T. & Alter, G. Natural killer cells in spontaneous control of HIV infection. *Curr. Opin. HIV AIDS* **6**, 208–213 (2011).
- 212.** Flores-Villanueva, P. O. *et al.* Control of HIV-1 viremia and protection from AIDS are associated with HLA-Bw4 homozygosity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 5140–5145 (2001).
- 213.** Walker-Sperling, V. E. *et al.* Factors Associated With the Control of Viral Replication and Virologic Breakthrough in a Recently Infected HIV-1 Controller. *EBioMedicine* **16**, 141–149 (2017).
- 214.** Post-Treatment Controllers Have Particular NK Cells With High Anti-HIV Capacity: VISCONTI Study. *CROI Conference* <https://www.croiconference.org/abstract/post-treatment-controllers-have-particular-nk-cells-high-anti-hiv-capacity-visconti-study/>.
- 215.** Huot, N. *et al.* Natural killer cells migrate into and control simian immunodeficiency virus replication in lymph node follicles in African green monkeys. *Nat. Med.* **23**, 1277–1286 (2017).
- 216.** Autran, B. *et al.* T cell receptor gamma/delta+ lymphocyte subsets during HIV infection. *Clin. Exp. Immunol.* **75**, 206–210 (1989).
- 217.** De Paoli, P. *et al.* A subset of gamma delta lymphocytes is increased during HIV-1 infection. *Clin. Exp. Immunol.* **83**, 187–191 (1991).
- 218.** Harris, L. D. *et al.* Mechanisms underlying $\gamma\delta$ T-cell subset perturbations in SIV-infected Asian rhesus macaques. *Blood* **116**, 4148–4157 (2010).

- 219.** Hermier, F. *et al.* Decreased blood TcR gamma delta+ lymphocytes in AIDS and p24-antigenemic HIV-1-infected patients. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **69**, 248–250 (1993).
- 220.** Pauza, C. D., Poonia, B., Li, H., Cairo, C. & Chaudhry, S. $\gamma\delta$ T Cells in HIV Disease: Past, Present, and Future. *Front. Immunol.* **5**, 687 (2015).
- 221.** Li, H. & Pauza, C. D. HIV envelope-mediated, CCR5/ α 4 β 7-dependent killing of CD4-negative $\gamma\delta$ T cells which are lost during progression to AIDS. *Blood* **118**, 5824–5831 (2011).
- 222.** Riedel, D. J. *et al.* Natural viral suppressors of HIV-1 have a unique capacity to maintain gammadelta T cells. *AIDS Lond. Engl.* **23**, 1955–1964 (2009).
- 223.** Chevalier, M. F. *et al.* $\gamma\delta$ T-cell subsets in HIV controllers: potential role of T $\gamma\delta$ 17 cells in the regulation of chronic immune activation. *AIDS Lond. Engl.* **33**, 1283–1292 (2019).
- 224.** Fausther-Bovendo, H. *et al.* NKG2C is a major triggering receptor involved in the V[delta]1 T cell-mediated cytotoxicity against HIV-infected CD4 T cells. *AIDS Lond. Engl.* **22**, 217–226 (2008).
- 225.** Garrido, C. *et al.* $\gamma\delta$ T cells: an immunotherapeutic approach for HIV cure strategies. *JCI Insight* **3**, 120121 (2018).
- 226.** Tuero, I., Venzon, D. & Robert-Guroff, M. Mucosal and Systemic $\gamma\delta$ + T Cells Associated with Control of Simian Immunodeficiency Virus Infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **197**, 4686–4695 (2016).
- 227.** Haase, A. T. Early events in sexual transmission of HIV and SIV and opportunities for interventions. *Annu. Rev. Med.* **62**, 127–139 (2011).
- 228.** Hansen, S. G. *et al.* Profound early control of highly pathogenic SIV by an effector memory T-cell vaccine. *Nature* **473**, 523–527 (2011).
- 229.** Hansen, S. G. *et al.* Immune clearance of highly pathogenic SIV infection. *Nature* **502**, 100–104 (2013).
- 230.** Hansen, S. G. *et al.* Cytomegalovirus Vectors Violate CD8+ T Cell Epitope Recognition Paradigms. *Science* **340**, 1237874 (2013).
- 231.** Hansen, S. G. *et al.* Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. *Nat. Med.* **15**, 293–299 (2009).
- 232.** Oxford, K. L. *et al.* Protein coding content of the ULb' region of wild-type rhesus cytomegalovirus. *Virology* **373**, 181–188 (2008).
- 233.** Lambotte, O. *et al.* Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. *AIDS Lond. Engl.* **23**, 897–906 (2009).

- 234.** Bailey, J. R. *et al.* Neutralizing antibodies do not mediate suppression of human immunodeficiency virus type 1 in elite suppressors or selection of plasma virus variants in patients on highly active antiretroviral therapy. *J. Virol.* **80**, 4758–4770 (2006).
- 235.** Sajadi, M. M. *et al.* Correlation between circulating HIV-1 RNA and broad HIV-1 neutralizing antibody activity. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **1999** **57**, 9–15 (2011).
- 236.** Doria-Rose, N. A. *et al.* Breadth of human immunodeficiency virus-specific neutralizing activity in sera: clustering analysis and association with clinical variables. *J. Virol.* **84**, 1631–1636 (2010).
- 237.** Rusert, P. *et al.* Determinants of HIV-1 broadly neutralizing antibody induction. *Nat. Med.* **22**, 1260–1267 (2016).
- 238.** Scheid, J. F. *et al.* Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature* **458**, 636–640 (2009).
- 239.** Barouch, D. H. *et al.* Therapeutic efficacy of potent neutralizing HIV-1-specific monoclonal antibodies in SHIV-infected rhesus monkeys. *Nature* **503**, 224–228 (2013).
- 240.** Shingai, M. *et al.* Antibody-mediated immunotherapy of macaques chronically infected with SHIV suppresses viraemia. *Nature* **503**, 277–280 (2013).
- 241.** Sourisseau, M., Sol-Foulon, N., Porrot, F., Blanchet, F. & Schwartz, O. Inefficient human immunodeficiency virus replication in mobile lymphocytes. *J. Virol.* **81**, 1000–1012 (2007).
- 242.** Abela, I. A. *et al.* Cell-cell transmission enables HIV-1 to evade inhibition by potent CD4bs directed antibodies. *PLoS Pathog.* **8**, e1002634 (2012).
- 243.** Mahalanabis, M. *et al.* Continuous Viral Escape and Selection by Autologous Neutralizing Antibodies in Drug-Naïve Human Immunodeficiency Virus Controllers. *J. Virol.* **83**, 662–672 (2009).
- 244.** Ackerman, M. E. *et al.* Polyfunctional HIV-Specific Antibody Responses Are Associated with Spontaneous HIV Control. *PLoS Pathog.* **12**, e1005315 (2016).
- 245.** Owen, R. E. *et al.* HIV+ elite controllers have low HIV-specific T cell activation yet maintain strong, polyfunctional T cell responses. *AIDS Lond. Engl.* **24**, 1095–1105 (2010).
- 246.** Ferre, A. L. *et al.* Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers: a potential correlate of immune control. *Blood* **113**, 3978–3989 (2009).
- 247.** Malhotra, U. *et al.* Role for HLA class II molecules in HIV-1 suppression and cellular immunity following antiretroviral treatment. *J. Clin. Invest.* **107**, 505–517 (2001).
- 248.** Vyakarnam, A. *et al.* Possession of human leucocyte antigen DQ6 alleles and the rate of CD4 T-cell decline in human immunodeficiency virus-1 infection. *Immunology* **112**, 136–142 (2004).

- 249.** Pallikkuth, S., Parmigiani, A. & Pahwa, S. The role of interleukin-21 in HIV infection. *Cytokine Growth Factor Rev.* **23**, 173–180 (2012).
- 250.** Iannello, A. *et al.* Decreased levels of circulating IL-21 in HIV-infected AIDS patients: correlation with CD4+ T-cell counts. *Viral Immunol.* **21**, 385–388 (2008).
- 251.** Yue, F. Y. *et al.* HIV-specific IL-21 producing CD4+ T cells are induced in acute and chronic progressive HIV infection and are associated with relative viral control. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 498–506 (2010).
- 252.** Chevalier, M. F. *et al.* HIV-1-specific interleukin-21+ CD4+ T cell responses contribute to durable viral control through the modulation of HIV-specific CD8+ T cell function. *J. Virol.* **85**, 733–741 (2011).
- 253.** van Grevenynghe, J. *et al.* Transcription factor FOXO3a controls the persistence of memory CD4(+) T cells during HIV infection. *Nat. Med.* **14**, 266–274 (2008).
- 254.** Descours, B. *et al.* Immune responses driven by protective human leukocyte antigen alleles from long-term nonprogressors are associated with low HIV reservoir in central memory CD4 T cells. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **54**, 1495–1503 (2012).
- 255.** Buzon, M. J. *et al.* Long-term antiretroviral treatment initiated at primary HIV-1 infection affects the size, composition, and decay kinetics of the reservoir of HIV-1-infected CD4 T cells. *J. Virol.* **88**, 10056–10065 (2014).
- 256.** Claireaux, M. *et al.* Low CCR5 expression protects HIV-specific CD4+ T cells of elite controllers from viral entry. *Nat. Commun.* **13**, 521 (2022).
- 257.** Vingert, B. *et al.* HIV Controller CD4+ T Cells Respond to Minimal Amounts of Gag Antigen Due to High TCR Avidity. *PLoS Pathog.* **6**, e1000780 (2010).
- 258.** Benati, D. *et al.* Public T cell receptors confer high-avidity CD4 responses to HIV controllers. *J. Clin. Invest.* **126**, 2093–2108 (2016).
- 259.** Douek, D. C. *et al.* HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature* **417**, 95–98 (2002).
- 260.** Ranasinghe, S. *et al.* HIV-specific CD4 T cell responses to different viral proteins have discordant associations with viral load and clinical outcome. *J. Virol.* **86**, 277–283 (2012).
- 261.** Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. J. Generation of lymphocytes in bone marrow and thymus. *Immunobiol. Immune Syst. Health Dis.* 5th Ed. (2001).
- 262.** Lind, E. F., Prockop, S. E., Porritt, H. E. & Petrie, H. T. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J. Exp. Med.* **194**, 127–134 (2001).

- 263.** Starr, T. K., Jameson, S. C. & Hogquist, K. A. Positive and negative selection of T cells. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 139–176 (2003).
- 264.** Han, J. & Zúñiga-Pflücker, J. C. A 2020 View of Thymus Stromal Cells in T Cell Development. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **206**, 249–256 (2021).
- 265.** von Freeden-Jeffry, U., Solvason, N., Howard, M. & Murray, R. The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity* **7**, 147–154 (1997).
- 266.** Anderson, G. & Jenkinson, E. J. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 31–40 (2001).
- 267.** Miyazaki, M. *et al.* Thymocyte proliferation induced by pre-T cell receptor signaling is maintained through polycomb gene product Bmi-1-mediated Cdkn2a repression. *Immunity* **28**, 231–245 (2008).
- 268.** Kawamoto, H. *et al.* Extensive proliferation of T cell lineage-restricted progenitors in the thymus: an essential process for clonal expression of diverse T cell receptor beta chains. *Eur. J. Immunol.* **33**, 606–615 (2003).
- 269.** Falk, I., Biro, J., Kohler, H. & Eichmann, K. Proliferation kinetics associated with T cell receptor-beta chain selection of fetal murine thymocytes. *J. Exp. Med.* **184**, 2327–2339 (1996).
- 270.** Takaba, H. & Takayanagi, H. The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. *Trends Immunol.* **38**, 805–816 (2017).
- 271.** Takada, K. & Takahama, Y. Positive-selection-inducing self-peptides displayed by cortical thymic epithelial cells. *Adv. Immunol.* **125**, 87–110 (2015).
- 272.** Förster, R., Davalos-Misslitz, A. C. & Rot, A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 362–371 (2008).
- 273.** Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M. & Hogquist, K. A. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 377–391 (2014).
- 274.** Al-Lazikani, B., Lesk, A. M. & Chothia, C. Canonical structures for the hypervariable regions of T cell alphabeta receptors. *J. Mol. Biol.* **295**, 979–995 (2000).
- 275.** De Simone, M., Rossetti, G. & Pagani, M. Single Cell T Cell Receptor Sequencing: Techniques and Future Challenges. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
- 276.** Fugmann, S. D., Lee, A. I., Shockett, P. E., Villy, I. J. & Schatz, D. G. The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 495–527 (2000).
- 277.** Gilfillan, S., Benoist, C. & Mathis, D. Mice lacking terminal deoxynucleotidyl transferase: adult mice with a fetal antigen receptor repertoire. *Immunol. Rev.* **148**, 201–219 (1995).

- 278.** Douek, D. C. *et al.* Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* **396**, 690–695 (1998).
- 279.** Cabaniols, J.-P., Fazilleau, N., Casrouge, A., Kourilsky, P. & Kanellopoulos, J. M. Most α/β T Cell Receptor Diversity Is Due to Terminal Deoxynucleotidyl Transferase. *J. Exp. Med.* **194**, 1385–1390 (2001).
- 280.** Nikolich-Žugich, J., Slifka, M. K. & Messaoudi, I. The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 123–132 (2004).
- 281.** Arstila, T. P. *et al.* A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* **286**, 958–961 (1999).
- 282.** Lin, M. Y. & Welsh, R. M. Stability and diversity of T cell receptor repertoire usage during lymphocytic choriomeningitis virus infection of mice. *J. Exp. Med.* **188**, 1993–2005 (1998).
- 283.** Sewell, A. K. Why must T cells be cross-reactive? *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 669–677 (2012).
- 284.** Bulek, A. M. *et al.* Structural basis for the killing of human beta cells by CD8(+) T cells in type 1 diabetes. *Nat. Immunol.* **13**, 283–289 (2012).
- 285.** Wooldridge, L. *et al.* A single autoimmune T cell receptor recognizes more than a million different peptides. *J. Biol. Chem.* **287**, 1168–1177 (2012).
- 286.** Schodin, B. A., Tsomides, T. J. & Kranz, D. M. Correlation Between the Number of T Cell Receptors Required for T Cell Activation and TCR–Ligand Affinity. *Immunity* **5**, 137–146 (1996).
- 287.** Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. J. Antigen recognition by T cells. *Immunobiol. Immune Syst. Health Dis. 5th Ed.* (2001).
- 288.** Campillo-Davo, D., Flumens, D. & Lion, E. The Quest for the Best: How TCR Affinity, Avidity, and Functional Avidity Affect TCR-Engineered T-Cell Antitumor Responses. *Cells* **9**, E1720 (2020).
- 289.** Viganò, S. *et al.* Functional Avidity: A Measure to Predict the Efficacy of Effector T Cells? *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 153863 (2012).
- 290.** Bromley, S. K. *et al.* The immunological synapse. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 375–396 (2001).
- 291.** Monks, C. R. F., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Sciaky, N. & Kupfer, A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* **395**, 82–86 (1998).
- 292.** Sánchez-Madrid, F. & del Pozo, M. A. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J.* **18**, 501–511 (1999).
- 293.** Lasserre, R. & Alcover, A. Cytoskeletal cross-talk in the control of T cell antigen receptor signaling. *FEBS Lett.* **584**, 4845–4850 (2010).

- 294.** Huppa, J. B. & Davis, M. M. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 973–983 (2003).
- 295.** Wherry, E. J., Puorro, K. A., Porgador, A. & Eisenlohr, L. C. The Induction of Virus-Specific CTL as a Function of Increasing Epitope Expression: Responses Rise Steadily Until Excessively High Levels of Epitope Are Attained. *J. Immunol.* **163**, 3735–3745 (1999).
- 296.** Hommel, M. & Hodgkin, P. D. TCR affinity promotes CD8+ T cell expansion by regulating survival. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**, 2250–2260 (2007).
- 297.** Zehn, D., Lee, S. Y. & Bevan, M. J. Complete but curtailed T-cell response to very low-affinity antigen. *Nature* **458**, 211–214 (2009).
- 298.** Duttagupta, P. A., Boesteanu, A. C. & Katsikis, P. D. COSTIMULATION SIGNALS FOR MEMORY CD8+ T CELLS DURING VIRAL INFECTIONS. *Crit. Rev. Immunol.* **29**, 469–486 (2009).
- 299.** Boise, L. H. *et al.* CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* **3**, 87–98 (1995).
- 300.** Hutloff, A. *et al.* ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* **397**, 263–266 (1999).
- 301.** Riley, J. L. & June, C. H. The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood* **105**, 13–21 (2005).
- 302.** Mescher, M. F. *et al.* Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol. Rev.* **211**, 81–92 (2006).
- 303.** Curtsinger, J. M., Valenzuela, J. O., Agarwal, P., Lins, D. & Mescher, M. F. Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **174**, 4465–4469 (2005).
- 304.** Curtsinger, J. M. *et al.* Inflammatory Cytokines Provide a Third Signal for Activation of Naive CD4+ and CD8+ T Cells. *J. Immunol.* **162**, 3256–3262 (1999).
- 305.** Love, P. E. & Hayes, S. M. ITAM-mediated signaling by the T-cell antigen receptor. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a002485 (2010).
- 306.** Gaud, G., Lesourne, R. & Love, P. E. Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 485–497 (2018).
- 307.** Horejsí, V., Zhang, W. & Schraven, B. Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 603–616 (2004).
- 308.** Krauss, S., Brand, M. D. & Buttgerit, F. Signaling Takes a Breath – New Quantitative Perspectives on Bioenergetics and Signal Transduction. *Immunity* **15**, 497–502 (2001).
- 309.** Michalek, R. D. & Rathmell, J. C. The metabolic life and times of a T-cell. *Immunol. Rev.* **236**, 190–202 (2010).

- 310.** Warburg, O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* **124**, 269–270 (1956).
- 311.** Wofford, J. A., Wieman, H. L., Jacobs, S. R., Zhao, Y. & Rathmell, J. C. IL-7 promotes Glut1 trafficking and glucose uptake via STAT5-mediated activation of Akt to support T-cell survival. *Blood* **111**, 2101–2111 (2008).
- 312.** Frauwirth, K. A. *et al.* The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity* **16**, 769–777 (2002).
- 313.** Jacobs, S. R. *et al.* Glucose uptake is limiting in T cell activation and requires CD28-mediated Akt-dependent and independent pathways. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **180**, 4476–4486 (2008).
- 314.** Rathmell, J. C., Vander Heiden, M. G., Harris, M. H., Frauwirth, K. A. & Thompson, C. B. In the absence of extrinsic signals, nutrient utilization by lymphocytes is insufficient to maintain either cell size or viability. *Mol. Cell* **6**, 683–692 (2000).
- 315.** Kaech, S. M. & Ahmed, R. Memory CD8⁺ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naïve cells. *Nat. Immunol.* **2**, 415–422 (2001).
- 316.** Almeida, J. R. *et al.* Antigen sensitivity is a major determinant of CD8⁺ T-cell polyfunctionality and HIV-suppressive activity. *Blood* **113**, 6351–6360 (2009).
- 317.** Seder, R. A., Darrah, P. A. & Roederer, M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 247–258 (2008).
- 318.** Osińska, I., Popko, K. & Demkow, U. Perforin: an important player in immune response. *Cent.-Eur. J. Immunol.* **39**, 109–115 (2014).
- 319.** Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. J. T cell-mediated cytotoxicity. *Immunobiol. Immune Syst. Health Dis. 5th Ed.* (2001).
- 320.** Harari, A., Bellutti Enders, F., Cellera, C., Bart, P.-A. & Pantaleo, G. Distinct profiles of cytotoxic granules in memory CD8 T cells correlate with function, differentiation stage, and antigen exposure. *J. Virol.* **83**, 2862–2871 (2009).
- 321.** Goping, I. S. *et al.* Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition. *Immunity* **18**, 355–365 (2003).
- 322.** Chowdhury, D. & Lieberman, J. Death by a Thousand Cuts: Granzyme Pathways of Programmed Cell Death. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 389–420 (2008).
- 323.** Kaschek, L., Zöphel, S., Knörck, A. & Hoth, M. A calcium optimum for cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell cytotoxicity. *Semin. Cell Dev. Biol.* **115**, 10–18 (2021).
- 324.** Rouvier, E., Luciani, M. F. & Golstein, P. Fas involvement in Ca²⁺-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J. Exp. Med.* **177**, 195–200 (1993).
- 325.** Stalder, T., Hahn, S. & Erb, P. Fas antigen is the major target molecule for CD4⁺ T cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* **152**, 1127–1133 (1994).
- 326.** Golstein, P. Cytolytic T-cell melodrama. *Nature* **327**, 12–12 (1987).

- 327.** Strasser, A., Jost, P. J. & Nagata, S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* **30**, 180–192 (2009).
- 328.** Hassin, D., Garber, O. G., Meiraz, A., Schiffenbauer, Y. S. & Berke, G. Cytotoxic T lymphocyte perforin and Fas ligand working in concert even when Fas ligand lytic action is still not detectable. *Immunology* **133**, 190–196 (2011).
- 329.** Kalia, V. & Sarkar, S. Regulation of Effector and Memory CD8 T Cell Differentiation by IL-2—A Balancing Act. *Front. Immunol.* **9**, 2987 (2018).
- 330.** Demers, K. R., Reuter, M. A. & Betts, M. R. CD8+ T-cell effector function and transcriptional regulation during HIV pathogenesis. *Immunol. Rev.* **254**, 190–206 (2013).
- 331.** Mackewicz, C. E., Barker, E., Greco, G., Reyes-Teran, G. & Levy, J. A. Do beta-chemokines have clinical relevance in HIV infection? *J. Clin. Invest.* **100**, 921–930 (1997).
- 332.** Trkola, A. *et al.* The CC-chemokine RANTES increases the attachment of human immunodeficiency virus type 1 to target cells via glycosaminoglycans and also activates a signal transduction pathway that enhances viral infectivity. *J. Virol.* **73**, 6370–6379 (1999).
- 333.** Badovinac, V. P., Porter, B. B. & Harty, J. T. CD8+ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nat. Immunol.* **5**, 809–817 (2004).
- 334.** Walzer, T. *et al.* Cutting Edge: Immediate RANTES Secretion by Resting Memory CD8 T Cells Following Antigenic Stimulation. *J. Immunol.* **170**, 1615–1619 (2003).
- 335.** Cui, W. & Kaech, S. M. Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells. *Immunol. Rev.* **236**, 151–166 (2010).
- 336.** Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708–712 (1999).
- 337.** Rutishauser, R. L. *et al.* Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8(+) T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties. *Immunity* **31**, 296–308 (2009).
- 338.** Esensten, J. H., Helou, Y. A., Chopra, G., Weiss, A. & Bluestone, J. A. CD28 costimulation: from mechanism to therapy. *Immunity* **44**, 973–988 (2016).
- 339.** Ochsenbein, A. F. *et al.* CD27 Expression Promotes Long-Term Survival of Functional Effector–Memory CD8+Cytotoxic T Lymphocytes in HIV-infected Patients. *J. Exp. Med.* **200**, 1407–1417 (2004).
- 340.** Huntington, N. D. & Tarlinton, D. M. CD45: direct and indirect government of immune regulation. *Immunol. Lett.* **94**, 167–174 (2004).

- 341.** Dock, J. N. & Effros, R. B. Role of CD8 T Cell Replicative Senescence in Human Aging and in HIV-mediated Immunosenescence. *Aging Dis.* **2**, 382–397 (2011).
- 342.** Gattinoni, L. *et al.* A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat. Med.* **17**, 1290–1297 (2011).
- 343.** Henning, A. N., Roychoudhuri, R. & Restifo, N. P. Epigenetic control of CD8+ T cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 340–356 (2018).
- 344.** Restifo, N. P. & Gattinoni, L. Lineage relationship of effector and memory T cells. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 556–563 (2013).
- 345.** Matano, T. *et al.* Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of chimeric simian/human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques. *J. Virol.* **72**, 164–169 (1998).
- 346.** Schmitz, J. E. *et al.* A nonhuman primate model for the selective elimination of CD8+ lymphocytes using a mouse-human chimeric monoclonal antibody. *Am. J. Pathol.* **154**, 1923–1932 (1999).
- 347.** Wherry, E. J. T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* **12**, 492–499 (2011).
- 348.** Sáez-Cirión, A. *et al.* HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 6776–6781 (2007).
- 349.** Hersperger, A. R. *et al.* Increased HIV-specific CD8+ T-cell cytotoxic potential in HIV elite controllers is associated with T-bet expression. *Blood* **117**, 3799–3808 (2011).
- 350.** Buggert, M. *et al.* T-bet and Eomes are differentially linked to the exhausted phenotype of CD8+ T cells in HIV infection. *PLoS Pathog.* **10**, e1004251 (2014).
- 351.** Appay, V. *et al.* HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J. Exp. Med.* **192**, 63–75 (2000).
- 352.** Roberts, E. R. *et al.* Collapse of Cytolytic Potential in SIV-Specific CD8+ T Cells Following Acute SIV Infection in Rhesus Macaques. *PLOS Pathog.* **12**, e1006135 (2016).
- 353.** Yan, J. *et al.* HIV-Specific CD8+ T Cells from Elite Controllers Are Primed for Survival. *J. Virol.* **87**, 5170–5181 (2013).
- 354.** Angin, M. *et al.* Metabolic plasticity of HIV-specific CD8+ T cells is associated with enhanced antiviral potential and natural control of HIV-1 infection. *Nat. Metab.* **1**, 704–716 (2019).
- 355.** Lichterfeld, M. *et al.* Telomerase activity of HIV-1-specific CD8+ T cells: constitutive up-regulation in controllers and selective increase by blockade of PD ligand 1 in progressors. *Blood* **112**, 3679–3687 (2008).

- 356.** Williams, K. *et al.* Epigenetic regulation of telomerase expression in HIV-1-specific CD8+ T cells. *AIDS Lond. Engl.* **24**, 1964–1966 (2010).
- 357.** Rutishauser, R. L. *et al.* TCF-1 regulates HIV-specific CD8+ T cell expansion capacity. *JCI Insight* **6**, 136648 (2021).
- 358.** Papagno, L. *et al.* Immune Activation and CD8+ T-Cell Differentiation towards Senescence in HIV-1 Infection. *PLOS Biol.* **2**, e20 (2004).
- 359.** Petrovas, C., Mueller, Y. M. & Katsikis, P. D. Apoptosis of HIV-specific CD8+ T cells: an HIV evasion strategy. *Cell Death Differ.* **12**, 859–870 (2005).
- 360.** Appay, V. & Iglesias, M. C. Antigen sensitivity and T-cell receptor avidity as critical determinants of HIV control. *Curr. Opin. HIV AIDS* **6**, 157–162 (2011).
- 361.** Almeida, J. R. *et al.* Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J. Exp. Med.* **204**, 2473–2485 (2007).
- 362.** Iglesias, M. C. *et al.* Escape from highly effective public CD8+ T-cell clonotypes by HIV. *Blood* **118**, 2138–2149 (2011).
- 363.** Kosmrlj, A. *et al.* Effects of thymic selection of the T-cell repertoire on HLA class I-associated control of HIV infection. *Nature* **465**, 350–354 (2010).
- 364.** Pohlmeier, C. W., Buckheit, R. W., Siliciano, R. F. & Blankson, J. N. CD8+ T cells from HLA-B*57 elite suppressors effectively suppress replication of HIV-1 escape mutants. *Retrovirology* **10**, 152 (2013).
- 365.** Boppana, S. & Goepfert, P. Understanding the CD8 T-cell response in natural HIV control. *F1000Research* **7**, F1000 Faculty Rev-985 (2018).
- 366.** Du, V. Y. *et al.* HIV-1-Specific CD8 T Cells Exhibit Limited Cross-Reactivity during Acute Infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **196**, 3276–3286 (2016).
- 367.** Pereyra, F. *et al.* Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *J. Infect. Dis.* **197**, 563–571 (2008).
- 368.** Sáez-Cirión, A. *et al.* Heterogeneity in HIV suppression by CD8 T cells from HIV controllers: association with Gag-specific CD8 T cell responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 7828–7837 (2009).
- 369.** Turk, G. *et al.* Early Gag immunodominance of the HIV-specific T-cell response during acute/early infection is associated with higher CD8+ T-cell antiviral activity and correlates with preservation of the CD4+ T-cell compartment. *J. Virol.* **87**, 7445–7462 (2013).
- 370.** Edwards, B. H. *et al.* Magnitude of Functional CD8+ T-Cell Responses to the Gag Protein of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Correlates Inversely with Viral Load in Plasma. *J. Virol.* **76**, 2298–2305 (2002).

- 371.** Kiepiela, P. *et al.* CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat. Med.* **13**, 46–53 (2007).
- 372.** Rivière, Y. *et al.* Gag-specific cytotoxic responses to HIV type 1 are associated with a decreased risk of progression to AIDS-related complex or AIDS. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **11**, 903–907 (1995).
- 373.** Jenness, W., Camara, M., Dièye, T., Mboup, S. & Kestens, L. Higher homologous and lower cross-reactive Gag-specific T-cell responses in human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) than in HIV-1 infection. *J. Virol.* **82**, 8619–8628 (2008).
- 374.** Leligdowicz, A. *et al.* Robust Gag-specific T cell responses characterize viremia control in HIV-2 infection. *J. Clin. Invest.* **117**, 3067–3074 (2007).
- 375.** Kestens, L. *et al.* Expression of activation antigens, HLA-DR and CD38, on CD8 lymphocytes during HIV-1 infection. *AIDS Lond. Engl.* **6**, 793–797 (1992).
- 376.** Kestens, L. *et al.* Selective increase of activation antigens HLA-DR and CD38 on CD4+ CD45RO+ T lymphocytes during HIV-1 infection. *Clin. Exp. Immunol.* **95**, 436–441 (1994).
- 377.** López, M. *et al.* Elite controllers display higher activation on central memory CD8 T cells than HIV patients successfully on HAART. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **27**, 157–165 (2011).
- 378.** Hua, S. *et al.* Potential Role for HIV-Specific CD38-/HLA-DR+ CD8+ T Cells in Viral Suppression and Cytotoxicity in HIV Controllers. *PLOS ONE* **9**, e101920 (2014).
- 379.** Cobos Jiménez, V. *et al.* T-Cell Activation Independently Associates With Immune Senescence in HIV-Infected Recipients of Long-term Antiretroviral Treatment. *J. Infect. Dis.* **214**, 216–225 (2016).
- 380.** Almeida, M., Cordero, M., Almeida, J. & Orfao, A. Relationship between CD38 expression on peripheral blood T-cells and monocytes, and response to antiretroviral therapy: a one-year longitudinal study of a cohort of chronically infected ART-naive HIV-1+ patients. *Cytometry B Clin. Cytom.* **72**, 22–33 (2007).
- 381.** Conrad, J. A. *et al.* Antiretroviral therapy reduces the magnitude and T cell receptor repertoire diversity of HIV-specific T cell responses without changing T cell clonotype dominance. *J. Virol.* **86**, 4213–4221 (2012).
- 382.** Brenchley, J. M. *et al.* Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat. Med.* **12**, 1365–1371 (2006).
- 383.** Schacker, T. W. *et al.* Collagen deposition in HIV-1 infected lymphatic tissues and T cell homeostasis. *J. Clin. Invest.* **110**, 1133–1139 (2002).

- 384.** Finkel, T. H. *et al.* Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nat. Med.* **1**, 129–134 (1995).
- 385.** Wolthers, K. C. *et al.* T cell telomere length in HIV-1 infection: no evidence for increased CD4+ T cell turnover. *Science* **274**, 1543–1547 (1996).
- 386.** Roederer, M. *et al.* CD8 naive T cell counts decrease progressively in HIV-infected adults. *J. Clin. Invest.* **95**, 2061–2066 (1995).
- 387.** Cao, W. *et al.* Early Initiation Rather Than Prolonged Duration of Antiretroviral Therapy in HIV Infection Contributes to the Normalization of CD8 T-Cell Counts. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **62**, 250–257 (2016).
- 388.** Lichtner, M. *et al.* Cytomegalovirus coinfection is associated with an increased risk of severe non-AIDS-defining events in a large cohort of HIV-infected patients. *J. Infect. Dis.* **211**, 178–186 (2015).
- 389.** Karrer, U. *et al.* Memory inflation: continuous accumulation of antiviral CD8+ T cells over time. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **170**, 2022–2029 (2003).
- 390.** Ogg, G. S. *et al.* Decay kinetics of human immunodeficiency virus-specific effector cytotoxic T lymphocytes after combination antiretroviral therapy. *J. Virol.* **73**, 797–800 (1999).
- 391.** Gray, C. M. *et al.* Frequency of class I HLA-restricted anti-HIV CD8+ T cells in individuals receiving highly active antiretroviral therapy (HAART). *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **162**, 1780–1788 (1999).
- 392.** Kalams, S. A. *et al.* Levels of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T-lymphocyte effector and memory responses decline after suppression of viremia with highly active antiretroviral therapy. *J. Virol.* **73**, 6721–6728 (1999).
- 393.** Appay, V. *et al.* Persistent HIV-1-specific cellular responses despite prolonged therapeutic viral suppression. *AIDS Lond. Engl.* **16**, 161–170 (2002).
- 394.** Addo, M. M. *et al.* Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *J. Virol.* **77**, 2081–2092 (2003).
- 395.** Rehr, M. *et al.* Emergence of Polyfunctional CD8+ T Cells after Prolonged Suppression of Human Immunodeficiency Virus Replication by Antiretroviral Therapy. *J. Virol.* **82**, 3391–3404 (2008).
- 396.** Streeck, H. *et al.* Antigen load and viral sequence diversification determine the functional profile of HIV-1-specific CD8+ T cells. *PLoS Med.* **5**, e100 (2008).

- 397.** Rinaldo, C. R. *et al.* Anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD8(+) T-lymphocyte reactivity during combination antiretroviral therapy in HIV-1-infected patients with advanced immunodeficiency. *J. Virol.* **74**, 4127–4138 (2000).
- 398.** Trautmann, L. *et al.* Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat. Med.* **12**, 1198–1202 (2006).
- 399.** Day, C. L. *et al.* PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* **443**, 350–354 (2006).
- 400.** Peretz, Y. *et al.* CD160 and PD-1 co-expression on HIV-specific CD8 T cells defines a subset with advanced dysfunction. *PLoS Pathog.* **8**, e1002840 (2012).
- 401.** Jones, R. B. *et al.* Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* **205**, 2763–2779 (2008).
- 402.** Migueles, S. A. *et al.* Defective human immunodeficiency virus-specific CD8+ T-cell polyfunctionality, proliferation, and cytotoxicity are not restored by antiretroviral therapy. *J. Virol.* **83**, 11876–11889 (2009).
- 403.** Migueles, S. A. *et al.* HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat. Immunol.* **3**, 1061–1068 (2002).
- 404.** Youngblood, B. *et al.* Cutting edge: Prolonged exposure to HIV reinforces a poised epigenetic program for PD-1 expression in virus-specific CD8 T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **191**, 540–544 (2013).
- 405.** García, F. *et al.* Dynamics of viral load rebound and immunological changes after stopping effective antiretroviral therapy. *AIDS Lond. Engl.* **13**, F79-86 (1999).
- 406.** Serwanga, J. *et al.* CD8 T-Cell Responses before and after Structured Treatment Interruption in Ugandan Adults Who Initiated ART with CD4 T Cells <200 Cell/ μ L: The DART Trial STI Substudy. *AIDS Res. Treat.* **2011**, 875028 (2011).
- 407.** Koofhethile, C. K. *et al.* CD8+ T Cell Breadth and Ex Vivo Virus Inhibition Capacity Distinguish between Viremic Controllers with and without Protective HLA Class I Alleles. *J. Virol.* **90**, 6818–6831 (2016).
- 408.** Betts, M. R. *et al.* Analysis of Total Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Specific CD4+ and CD8+ T-Cell Responses: Relationship to Viral Load in Untreated HIV Infection. *J. Virol.* **75**, 11983–11991 (2001).
- 409.** Oxenius, A. *et al.* Early highly active antiretroviral therapy for acute HIV-1 infection preserves immune function of CD8+ and CD4+ T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 3382–3387 (2000).
- 410.** Takata, H. *et al.* Long-term antiretroviral therapy initiated in acute HIV infection prevents residual dysfunction of HIV-specific CD8+ T cells. *eBioMedicine* **84**, (2022).

- 411.** Zhang, H., Weyand, C. M. & Goronzy, J. J. Hallmarks of the aging T-cell system. *FEBS J.* **288**, 7123–7142 (2021).
- 412.** Weiskopf, D., Weinberger, B. & Grubeck-Loebenstien, B. The aging of the immune system. *Transpl. Int.* **22**, 1041–1050 (2009).
- 413.** Targonski, P. V., Jacobson, R. M. & Poland, G. A. Immunosenescence: role and measurement in influenza vaccine response among the elderly. *Vaccine* **25**, 3066–3069 (2007).
- 414.** Mallapaty, S. The coronavirus is most deadly if you are older and male — new data reveal the risks. *Nature* **585**, 16–17 (2020).
- 415.** Qi, Q., Zhang, D. W., Weyand, C. M. & Goronzy, J. J. Mechanisms shaping the naïve T cell repertoire in the elderly — Thymic involution or peripheral homeostatic proliferation? *Exp. Gerontol.* **54**, 71–74 (2014).
- 416.** Palmer, D. B. The Effect of Age on Thymic Function. *Front. Immunol.* **4**, 316 (2013).
- 417.** Czesnikiewicz-Guzik, M. *et al.* T cell subset-specific susceptibility to aging. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **127**, 107–118 (2008).
- 418.** Wertheimer, A. M. *et al.* Aging and cytomegalovirus infection differentially and jointly affect distinct circulating T cell subsets in humans. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **192**, 2143–2155 (2014).
- 419.** Dzierzak, E. Hematopoietic stem cells and their precursors: developmental diversity and lineage relationships. *Immunol. Rev.* **187**, 126–138 (2002).
- 420.** Kuranda, K. *et al.* Age-related changes in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Aging Cell* **10**, 542–546 (2011).
- 421.** Pang, W. W. *et al.* Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 20012–20017 (2011).
- 422.** Nilsson, A. R., Soneji, S., Adolfsson, S., Bryder, D. & Pronk, C. J. Human and Murine Hematopoietic Stem Cell Aging Is Associated with Functional Impairments and Intrinsic Megakaryocytic/Erythroid Bias. *PLOS ONE* **11**, e0158369 (2016).
- 423.** Rube, C. E. *et al.* Accumulation of DNA Damage in Hematopoietic Stem and Progenitor Cells during Human Aging. *PLOS ONE* **6**, e17487 (2011).
- 424.** Fali, T. *et al.* Elderly human hematopoietic progenitor cells express cellular senescence markers and are more susceptible to pyroptosis. *JCI Insight* **3**, e95319, 95319 (2018).
- 425.** Martínez-Zamudio, R. I. *et al.* Senescence-associated β -galactosidase reveals the abundance of senescent CD8⁺ T cells in aging humans. *Aging Cell* **20**, e13344 (2021).
- 426.** Gupta, S. Membrane signal transduction in T cells in aging humans. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **568**, 277–282 (1989).

- 427.** Whisler, R. L., Beiqing, L. & Chen, M. Age-related decreases in IL-2 production by human T cells are associated with impaired activation of nuclear transcriptional factors AP-1 and NF-AT. *Cell. Immunol.* **169**, 185–195 (1996).
- 428.** Larbi, A., Dupuis, G., Douziech, N., Khalil, A. & Fülöp, T. Low-grade inflammation with aging has consequences for T-lymphocyte signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1030**, 125–133 (2004).
- 429.** Chakravarti, B., Chakravarti, D. N., Devecis, J., Seshi, B. & Abraham, G. N. Effect of age on mitogen induced protein tyrosine phosphorylation in human T cell and its subsets: down-regulation of tyrosine phosphorylation of ZAP-70. *Mech. Ageing Dev.* **104**, 41–58 (1998).
- 430.** Ucar, D. *et al.* The chromatin accessibility signature of human immune aging stems from CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* **214**, 3123–3144 (2017).
- 431.** Moskowitz, D. M. *et al.* Epigenomics of human CD8 T cell differentiation and aging. *Sci. Immunol.* **2**, eaag0192 (2017).
- 432.** Bradley, L. M., Haynes, L. & Swain, S. L. IL-7: maintaining T-cell memory and achieving homeostasis. *Trends Immunol.* **26**, 172–176 (2005).
- 433.** George, V. K. *et al.* HIV infection Worsens Age-Associated Defects in Antibody Responses to Influenza Vaccine. *J. Infect. Dis.* **211**, 1959–1968 (2015).
- 434.** Parmigiani, A. *et al.* Impaired antibody response to influenza vaccine in HIV-infected and uninfected aging women is associated with immune activation and inflammation. *PloS One* **8**, e79816 (2013).
- 435.** Fali, T. *et al.* New Insights into Lymphocyte Differentiation and Aging from Telomere Length and Telomerase Activity Measurements. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **202**, 1962–1969 (2019).
- 436.** Picelli, S. *et al.* Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nat. Protoc.* **9**, 171–181 (2014).
- 437.** Lun, A. T., Bach, K. & Marioni, J. C. Pooling across cells to normalize single-cell RNA sequencing data with many zero counts. *Genome Biol.* **17**, 75 (2016).
- 438.** Lê Cao, K.-A., Boitard, S. & Besse, P. Sparse PLS discriminant analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. *BMC Bioinformatics* **12**, 253 (2011).
- 439.** Bolotin, D. A. *et al.* MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nat. Methods* **12**, 380–381 (2015).
- 440.** Lissina, A. *et al.* Priming of Qualitatively Superior Human Effector CD8+ T Cells Using TLR8 Ligand Combined with FLT3 Ligand. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **196**, 256–263 (2016).

- 441.** Briceño, O. *et al.* Reduced naïve CD8⁺ T-cell priming efficacy in elderly adults. *Aging Cell* **15**, 14–21 (2016).
- 442.** Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**, 373–384 (2010).
- 443.** Coffman, R. L., Sher, A. & Seder, R. A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* **33**, 492–503 (2010).
- 444.** Chauvier, D., Ankri, S., Charriaut-Marlangue, C., Casimir, R. & Jacotot, E. Broad-spectrum caspase inhibitors: from myth to reality? *Cell Death Differ.* **14**, 387–391 (2007).
- 445.** THE SWISS HIV COHORT STUDY. Expression of CD28 and CD38 by CD8⁺ T lymphocytes in HIV-1 infection correlates with markers of disease severity and changes towards normalization under treatment. *Clin. Exp. Immunol.* **115**, 458–463 (1999).
- 446.** Effros, R. B. *et al.* Shortened telomeres in the expanded CD28-CD8⁺ cell subset in HIV disease implicate replicative senescence in HIV pathogenesis. *AIDS Lond. Engl.* **10**, F17-22 (1996).
- 447.** Cura Daball, P. *et al.* CD57 identifies T cells with functional senescence before terminal differentiation and relative telomere shortening in patients with activated PI3 kinase delta syndrome. *Immunol. Cell Biol.* **96**, 1060–1071 (2018).
- 448.** Duvall, M. G. *et al.* Polyfunctional T cell responses are a hallmark of HIV-2 infection. *Eur. J. Immunol.* **38**, 350–363 (2008).
- 449.** Leligdowicz, A. *et al.* Highly avid, oligoclonal, early-differentiated antigen-specific CD8⁺ T cells in chronic HIV-2 infection. *Eur. J. Immunol.* **40**, 1963–1972 (2010).
- 450.** Angin, M. *et al.* Preservation of Lymphopoietic Potential and Virus Suppressive Capacity by CD8⁺ T Cells in HIV-2–Infected Controllers. *J. Immunol.* **197**, 2787–2795 (2016).
- 451.** Quigley, M. *et al.* Transcriptional analysis of HIV-specific CD8⁺ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nat. Med.* **16**, 1147–1151 (2010).
- 452.** Bozorgmehr, N. *et al.* Expanded antigen-experienced CD160⁺CD8⁺effector T cells exhibit impaired effector functions in chronic lymphocytic leukemia. *J. Immunother. Cancer* **9**, e002189 (2021).
- 453.** Acharya, N. *et al.* Endogenous Glucocorticoid Signaling Regulates CD8⁺ T Cell Differentiation and Development of Dysfunction in the Tumor Microenvironment. *Immunity* **53**, 658-671.e6 (2020).
- 454.** Hung, M. H. *et al.* Tumor methionine metabolism drives T-cell exhaustion in hepatocellular carcinoma. *Nat. Commun.* **12**, 1455 (2021).

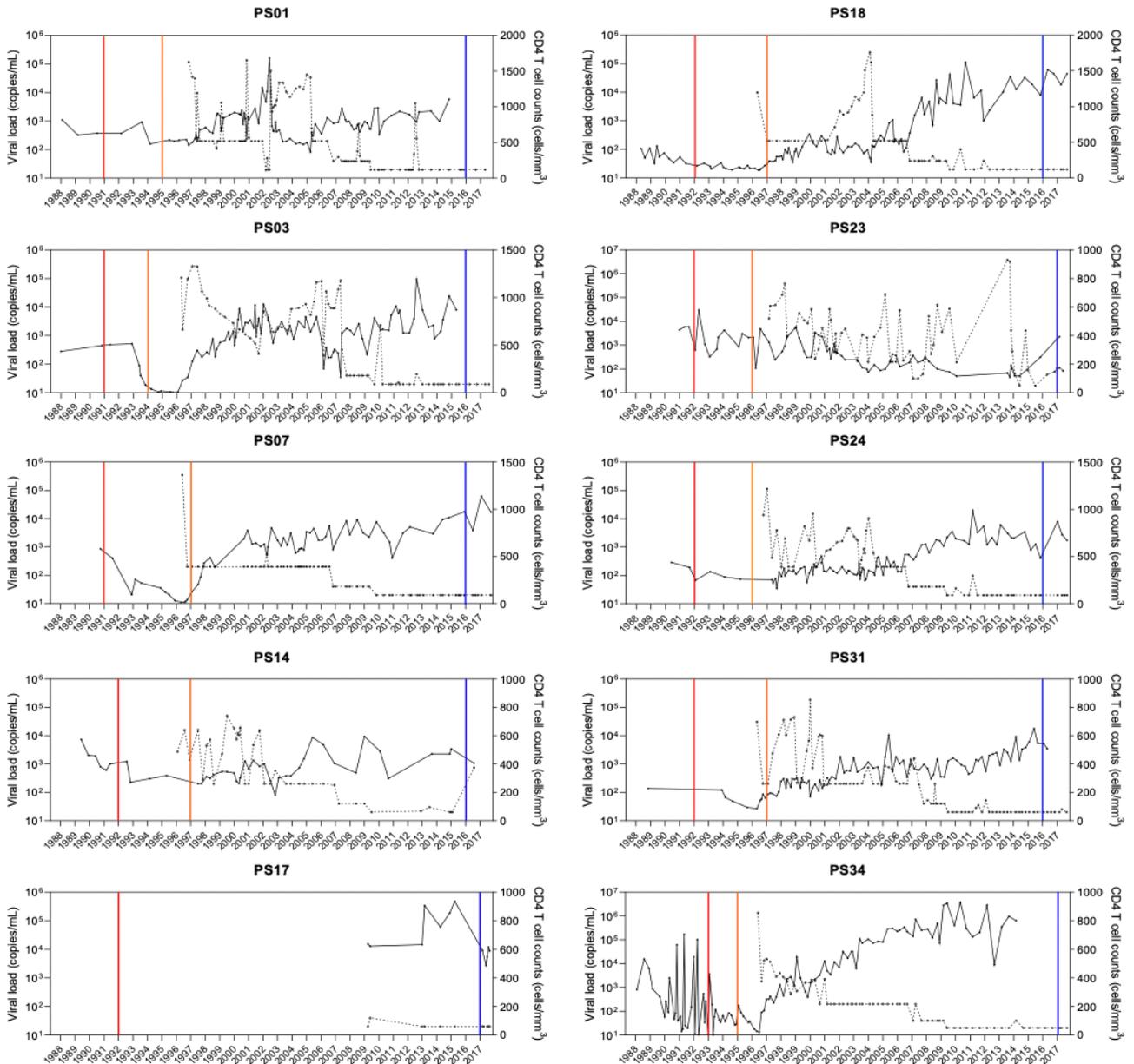
455. Kalia, V. *et al.* Prolonged interleukin-2Ralpha expression on virus-specific CD8+ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. *Immunity* **32**, 91–103 (2010).
456. Yasuma-Mitobe, K. & Matsuoka, M. The Roles of Coinhibitory Receptors in Pathogenesis of Human Retroviral Infections. *Front. Immunol.* **9**, 2755 (2018).
457. Yin, X. *et al.* Expression of the Inhibitory Receptor TIGIT Is Up-Regulated Specifically on NK Cells With CD226 Activating Receptor From HIV-Infected Individuals. *Front. Immunol.* **9**, 2341 (2018).
458. Shasha, D. *et al.* Elite controller CD8+ T cells exhibit comparable viral inhibition capacity, but better sustained effector properties compared to chronic progressors. *J. Leukoc. Biol.* **100**, 1425–1433 (2016).
459. Appay, V. *et al.* Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat. Med.* **8**, 379–385 (2002).
460. Weng, N.-P., Akbar, A. N. & Goronzy, J. CD28(-) T cells: their role in the age-associated decline of immune function. *Trends Immunol.* **30**, 306–312 (2009).
461. Vallejo, A. N. *et al.* Molecular basis for the loss of CD28 expression in senescent T cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 46940–46949 (2002).
462. Zehn, D., Thimme, R., Lugli, E., de Almeida, G. P. & Oxenius, A. ‘Stem-like’ precursors are the fount to sustain persistent CD8+ T cell responses. *Nat. Immunol.* **23**, 836–847 (2022).
463. Passaes, C. *et al.* Optimal Maturation of the SIV-Specific CD8+ T Cell Response after Primary Infection Is Associated with Natural Control of SIV: ANRS SIC Study. *Cell Rep.* **32**, 108174 (2020).
464. Fletcher, C. V. *et al.* Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 2307–2312 (2014).
465. Connick, E. *et al.* CTL fail to accumulate at sites of HIV-1 replication in lymphoid tissue. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 6975–6983 (2007).
466. Folkvord, J. M., Armon, C. & Connick, E. Lymphoid follicles are sites of heightened human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication and reduced antiretroviral effector mechanisms. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **21**, 363–370 (2005).
467. Brooks, D. G., McGavern, D. B. & Oldstone, M. B. A. Reprogramming of antiviral T cells prevents inactivation and restores T cell activity during persistent viral infection. *J. Clin. Invest.* **116**, 1675–1685 (2006).
468. Angelosanto, J. M., Blackburn, S. D., Crawford, A. & Wherry, E. J. Progressive loss of memory T cell potential and commitment to exhaustion during chronic viral infection. *J. Virol.* **86**, 8161–8170 (2012).

- 469.** Yates, K. B. *et al.* Epigenetic scars of CD8⁺ T cell exhaustion persist after cure of chronic infection in humans. *Nat. Immunol.* **22**, 1020–1029 (2021).
- 470.** Bally, A. P. R., Austin, J. W. & Boss, J. M. Genetic and Epigenetic Regulation of PD-1 Expression. *J. Immunol.* **196**, 2431–2437 (2016).
- 471.** Lissina, A., Chakrabarti, L. A., Takiguchi, M. & Appay, V. TCR clonotypes: molecular determinants of T-cell efficacy against HIV. *Curr. Opin. Virol.* **16**, 77–85 (2016).
- 472.** Appay, V. & Kelleher, A. D. Immune activation and immune aging in HIV infection. *Curr. Opin. HIV AIDS* **11**, 242–249 (2016).
- 473.** Babu, H. *et al.* Systemic Inflammation and the Increased Risk of Inflamm-Aging and Age-Associated Diseases in People Living With HIV on Long Term Suppressive Antiretroviral Therapy. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
- 474.** Lagathu, C. *et al.* Basic science and pathogenesis of ageing with HIV: potential mechanisms and biomarkers. *AIDS Lond. Engl.* **31 Suppl 2**, S105–S119 (2017).
- 475.** Julg, B. *et al.* Enhanced Anti-HIV Functional Activity Associated with Gag-Specific CD8 T-Cell Responses. *J. Virol.* **84**, 5540–5549 (2010).
- 476.** Klenerman, P., Wu, Y. & Phillips, R. HIV: current opinion in escapology. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 408–413 (2002).
- 477.** Zafiroopoulos, A., Barnes, E., Piggott, C. & Klenerman, P. Analysis of ‘driver’ and ‘passenger’ CD8⁺ T-cell responses against variable viruses. *Proc. Biol. Sci.* **271 Suppl 3**, S53-56 (2004).
- 478.** Murakoshi, H. *et al.* CD8⁺ T cells specific for conserved, cross-reactive Gag epitopes with strong ability to suppress HIV-1 replication. *Retrovirology* **15**, 46 (2018).
- 479.** Perdomo-Celis, F. *et al.* Reprogramming dysfunctional CD8⁺ T cells to promote properties associated with natural HIV control. *J. Clin. Invest.* **132**, (2022).
- 480.** Guo, Y. *et al.* Metabolic reprogramming of terminally exhausted CD8⁺ T cells by IL-10 enhances anti-tumor immunity. *Nat. Immunol.* **22**, 746–756 (2021).
- 481.** Gupta, S. S., Wang, J. & Chen, M. Metabolic Reprogramming in CD8⁺ T Cells During Acute Viral Infections. *Front. Immunol.* **11**, (2020).
- 482.** Vodnala, S. K. *et al.* T cell stemness and dysfunction in tumors are triggered by a common mechanism. *Science* **363**, eaau0135 (2019).
- 483.** Sade-Feldman, M. *et al.* Defining T Cell States Associated with Response to Checkpoint Immunotherapy in Melanoma. *Cell* **175**, 998-1013.e20 (2018).
- 484.** Lissina, A. *et al.* Priming of Qualitatively Superior Human Effector CD8⁺ T Cells Using TLR8 Ligand Combined with FLT3 Ligand. *J. Immunol.* **196**, 256–263 (2016).
- 485.** Meås, H. Z. *et al.* Sensing of HIV-1 by TLR8 activates human T cells and reverses latency. *Nat. Commun.* **11**, 147 (2020).

- 486.** Schlaepfer, E. & Speck, R. F. TLR8 activates HIV from latently infected cells of myeloid-monocytic origin directly via the MAPK pathway and from latently infected CD4+ T cells indirectly via TNF- α . *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **186**, 4314–4324 (2011).
- 487.** Kübler, H. *et al.* Self-adjuvanted mRNA vaccination in advanced prostate cancer patients: a first-in-man phase I/IIa study. *J. Immunother. Cancer* **3**, 26 (2015).
- 488.** Topol, E. J. Messenger RNA vaccines against SARS-CoV-2. *Cell* **184**, 1401 (2021).
- 489.** Polack, F. P. *et al.* Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* **383**, 2603–2615 (2020).
- 490.** Luchner, M., Reinke, S. & Milicic, A. TLR Agonists as Vaccine Adjuvants Targeting Cancer and Infectious Diseases. *Pharmaceutics* **13**, 142 (2021).
- 491.** Bhardwaj, N., Gnjatic, S. & Sawhney, N. B. TLR AGONISTS: Are They Good Adjuvants? *Cancer J. Sudbury Mass* **16**, 382–391 (2010).
- 492.** Borducchi, E. N. *et al.* Ad26/MVA therapeutic vaccination with TLR7 stimulation in SIV-infected rhesus monkeys. *Nature* **540**, 284–287 (2016).
- 493.** Borducchi, E. N. *et al.* Antibody and TLR7 agonist delay viral rebound in SHIV-infected monkeys. *Nature* **563**, 360–364 (2018).
- 494.** Liu, J. *et al.* Antibody-mediated protection against SHIV challenge includes systemic clearance of distal virus. *Science* **353**, 1045–1049 (2016).
- 495.** Nishimura, Y. *et al.* Early antibody therapy can induce long-lasting immunity to SHIV. *Nature* **543**, 559–563 (2017).
- 496.** Fukazawa, Y. *et al.* B cell follicle sanctuary permits persistent productive simian immunodeficiency virus infection in elite controllers. *Nat. Med.* **21**, 132–139 (2015).
- 497.** Adams, P. *et al.* Cytotoxic CD8+ T Cells Expressing CXCR5 Are Detectable in HIV-1 Elite Controllers After Prolonged In Vitro Peptide Stimulation. *Front. Immunol.* **11**, (2021).
- 498.** Mylvaganam, G. H. *et al.* Dynamics of SIV-specific CXCR5+ CD8 T cells during chronic SIV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 1976–1981 (2017).
- 499.** Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 15545–15550 (2005).

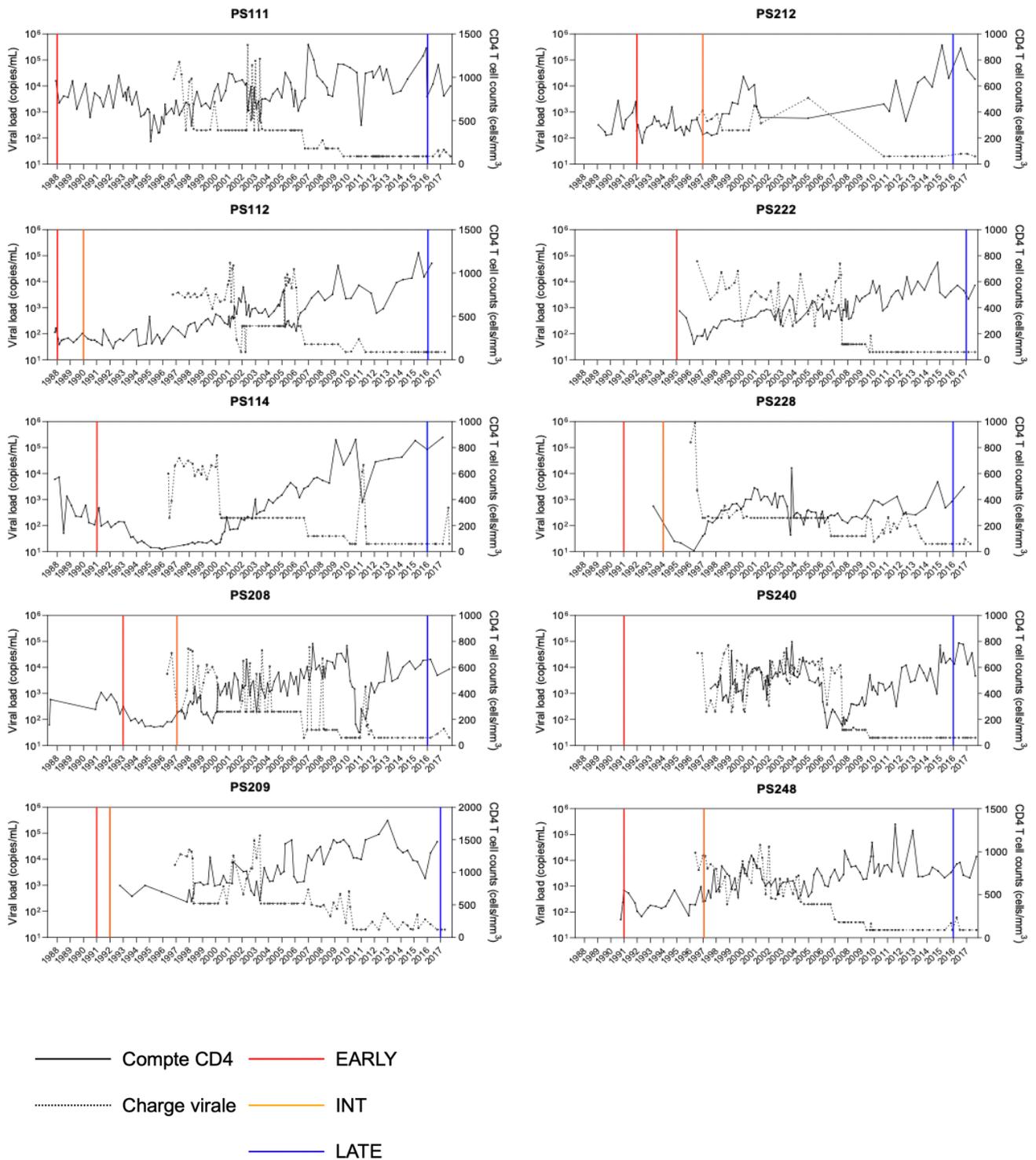
ANNEXES

Annexe 1 Partie 1 – Évolution de la charge virale et du compte LT CD4 au cours du suivi des individus de la cohorte IMMUNOCO



——— Compte CD4 ——— EARLY
 Charge virale ——— INT
 ——— LATE

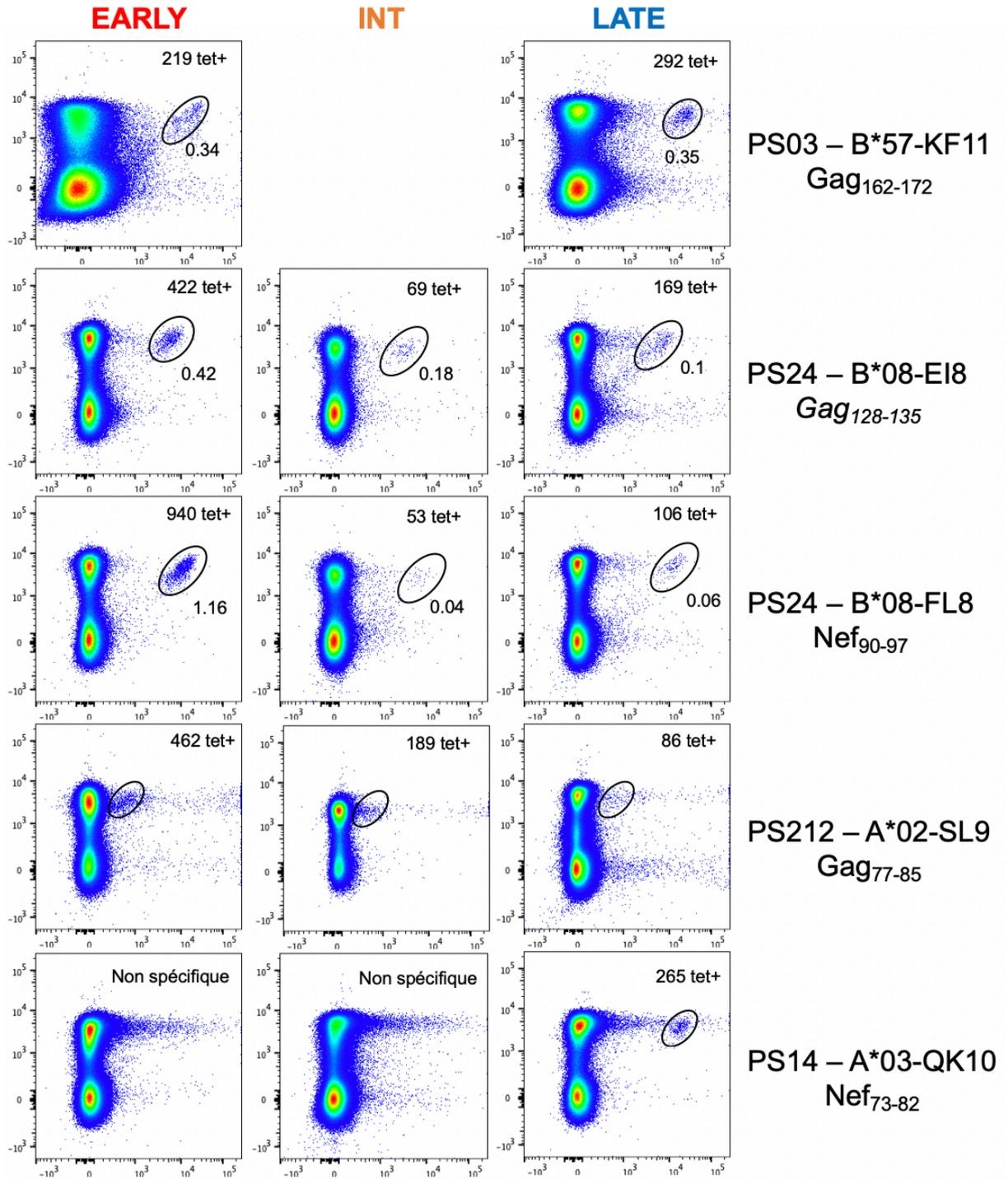
Annexe 1 Partie 2 – Évolution de la charge virale et du compte LT CD4 au cours du suivi de individus de la cohorte IMMUNOCO



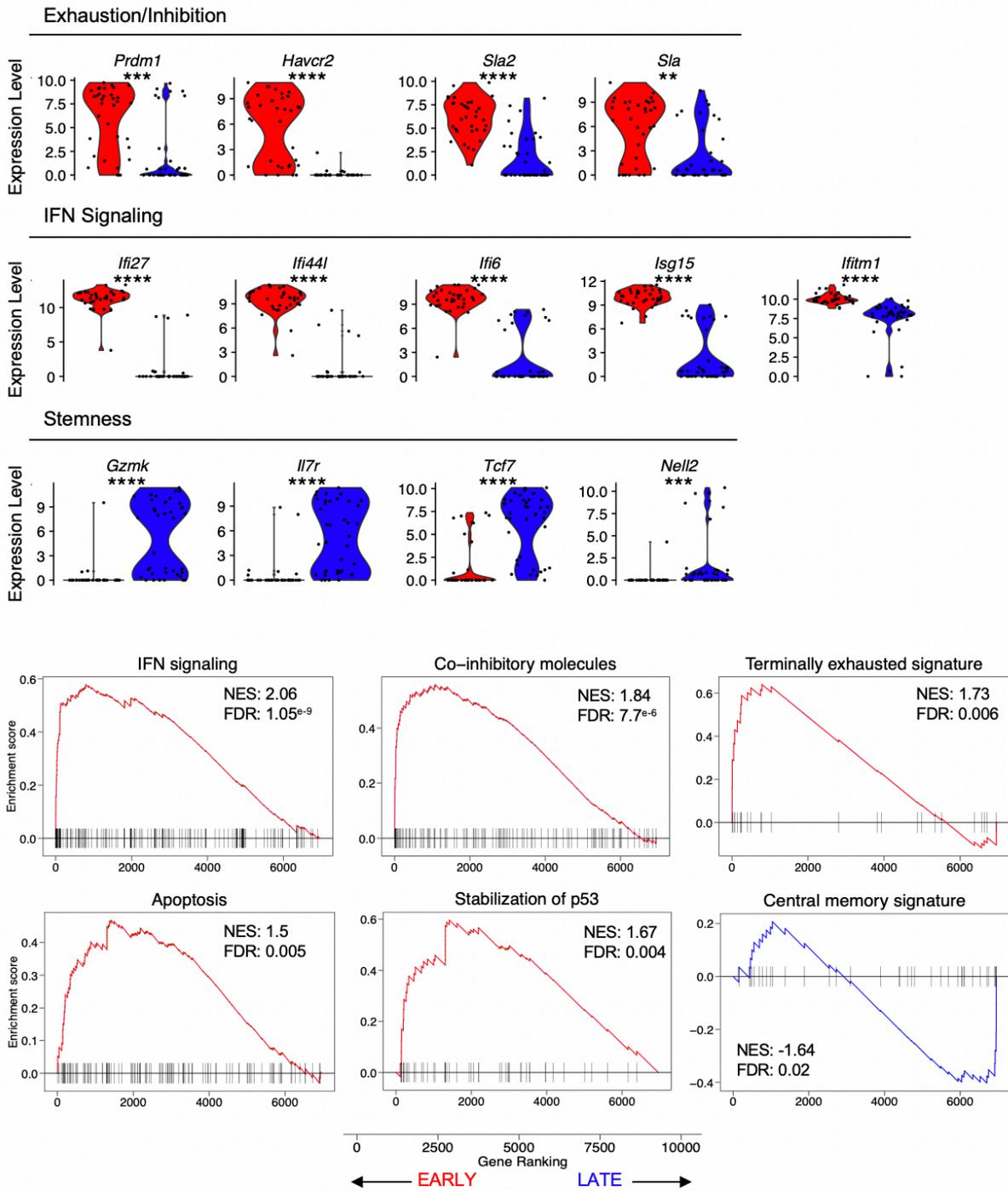
Annexe 2 – Réponse LT CD8 spécifique du virus testée et détectée au sein des individus de la cohorte IMMUNOCO avec un HLA compatible

	HLA	Epitope testé	Réponse détectée		
			EARLY	INT	LATE
PS01	A*02	SL9	SL9	SL9	
PS23	A*02	SL9			
PS31	A*02	SL9			
PS212	A*02	SL9	SL9	SL9	SL9
PS17	A*02 A*03	SL9 QK10, RY10	SL9 QK10, RY10		
PS24	A*02 B*08	EI8, FL8	EI8, FL8	EI8, FL8	EI8, FL8
PS03	A*02 B*57	KF11	KF11		KF11
PS114	A*02 B*57	SL9 KF11, TW10	SL9 KF11, TW10		SL9 KF11
PS112	A*03 B*07	QK10, RY10 IL9, RL9			
PS14	A*03 B*35	QK10, RY10		QK10	QK10
PS111	B*08 B*57	EI8, FL8	FL8		FL8

Annexe 3 – Populations LT CD8 spécifique du virus triés pour le scRNAseq



Annexe 4 – Analyse transcriptomique de la réponse B*57-KF11 de PS03



Annexe 5 – Séquence du VIH-1 sur les épitopes étudiés au cours du temps

PS24			
Time-point	B*08-EI8 (Gag ₂₆₀₋₂₆₇)	B*08-FL8 (Nef ₉₀₋₉₇)	
HXB2	EIIYKRWII	FLKEKGGL	
1992 (EARLY)	-----	-----	
1996 (INT)	-----	-----M-----	
2012	-----	-----K-----	
2016 (LATE)	-----	-----M-----	

PS03	
Time-point	B*57-KF11 (Gag ₁₆₂₋₁₇₂)
HXB2	KAFSPEVIPMF
1991 (EARLY)	-----
1994 (INT)	-----
2012	-----
2016 (LATE)	-----

PS14	
Time-point	A*03-QK10 (Nef ₇₃₋₈₂)
HXB2	QVPLRPMTYK
1992 (EARLY)	-----F-----
2012	-----F-----
2016 (LATE)	-----F-----

PS17			
Time-point	A*02-SL9 (Gag ₇₇₋₈₅)	A*03-RY10 (Gag ₂₀₋₂₉)	A*03-QK10 (Nef ₇₃₋₈₂)
HXB2	SLYNTVATL	RLRPGGKKKY	QVPLRPMTYK
1992 (EARLY)	-----	-----K----- R T	-----
2013	-----	-----R----- M	-----
2016 (LATE)	-----	Q---E-Q-S-	-----

PS114		
Time-point	B*57-KF11 (Gag ₁₆₂₋₁₇₂)	B*57-TW10 (Gag ₂₄₀₋₂₄₉)
HXB2	KAFSPEVIPMF	TSTLQEQIGW
1991 (EARLY)	-----	--N-----Q-
2012	-----	--N-----Q-
2016 (LATE)	-----	--N-----Q-

Annexe 6 – Composition clonotypique de la réponse LT CD8 spécifique de FL8 (PS24)

PS24 B*08-FL8 (Nef)

	TRBV	CDR3.aa	TRBJ	Freq	TRAV	CDR3.aa	TRAJ	Freq
EARLY	TRBV5-6	CASSTGTGSAQETQYF	TRBJ2-5	90	TRAV12-2	CAVRGSGTYKYIF	TRAJ40	87,3
	TRBV7-8	CASSPIEGIVTEAFF	TRBJ1-1	1,43	TRAV1-2	CAVRDLGTYKYIF	TRAJ40	1,59
	TRBV15	CATSRGGGLLTGELFF	TRBJ2-2	1,43	TRAV19	CALSEETSNTGKLIF	TRAJ37	1,59
	TRBV3-1	CASSQERTTPYNEQFF	TRBJ2-1	1,43	TRAV1-1	CARLNSATNKLIF	TRAJ32	1,59
	TRBV9	CASSVGAGPYEQYF	TRBJ2-7	1,43	TRAV19	CALSELGGSNYKLTFF	TRAJ53	1,59
	TRBV12-3	CASSVGGFYNEQFF	TRBJ2-1	1,43	TRAV19	CALSESGDNDMRF	TRAJ43	1,59
	TRBV11-3	CASSPLGEVETGELFF	TRBJ2-2	1,43	TRAV25	CAGYTNAGKSTF	TRAJ27	1,59
	TRBV28	CASSGLGGDTQYF	TRBJ2-3	1,43	TRAV27	CAGARNSGGSNYKLTFF	TRAJ53	1,59
INT	TRBV5-6	CASSTGTGSAQETQYF	TRBJ2-5	57,14	TRAV12-2	CAVRGSGTYKYIF	TRAJ40	53,33
	TRBV14	CASSQDRGAGANVLTF	TRBJ2-6	4,76	TRAV5	CAPSGNYGGSQGNLIF	TRAJ42	6,67
	TRBV27	CASSLGGQGFYEQYF	TRBJ2-7	4,76	TRAV3	CAVRDDWDFGNEKLTFF	TRAJ48	6,67
	TRBV7-2	CASSPGFSGELFF	TRBJ2-2	4,76	TRAV12-1	CVVNKGDMRF	TRAJ43	6,67
	TRBV5-6	CASSLKDSYEQYF	TRBJ2-7	4,76	TRAV9-2	CALESLYNNDMRF	TRAJ43	6,67
	TRBV7-9	CASSPPTGSYEQYF	TRBJ2-7	4,76	TRAV1-1	CAASNTGKLIF	TRAJ37	6,67
	TRBV7-3	CASSFAGGADTQYF	TRBJ2-3	4,76	TRAV6	CALPLWDTGFQKLVF	TRAJ8	6,67
	TRBV27	CASSPRDTRAEAFF	TRBJ1-1	4,76	TRAV8-3	CAVDNFNKFYF	TRAJ21	6,67
	TRBV27	CASSTSGASNEKLF	TRBJ1-4	4,76				
	TRBV30	CAWSPLSGGSNTEAFF	TRBJ1-1	4,76				
	LATE	TRBV2	CASSEFGAAVYEQYF	TRBJ2-7	45,78	TRAV3	CAVREAGGYQKVTFF	TRAJ13
TRBV5-6		CASSTGTGSAQETQYF	TRBJ2-5	26,51	TRAV12-2	CAVRGSGTYKYIF	TRAJ40	27,4
TRBV7-9		CASSPPTGSYEQYF	TRBJ2-7	4,82	TRAV12-1	CVSYNTNAGKSTF	TRAJ27	2,74
TRBV20-1		CSARDSVTGGGYSPLHF	TRBJ1-6	3,61	TRAV13-1	CAAKTSGTYKYIF	TRAJ40	2,74
TRBV7-8		CASSPIEGIVTEAFF	TRBJ1-1	2,41	TRAV8-3	CAVDNFNKFYF	TRAJ21	2,74
TRBV11-2		CASSLGGWGTGYEQYF	TRBJ2-7	2,41	TRAV12-2	CAVRRAGTYKYIF	TRAJ40	2,74
TRBV15		CATSRGGGLTNTGELFF	TRBJ2-2	2,41	TRAV3	CAVRDNQRANQFYF	TRAJ49	1,37
TRBV7-3		CASSSTGGGTEAFF	TRBJ1-1	1,2	TRAV17	CATDFFGNEKLTFF	TRAJ48	1,37
TRBV15		CATSRGTVSYEQYF	TRBJ2-7	1,2	TRAV19	CALSSYDMRF	TRAJ43	1,37
TRBV7-2		CASSADSYNEQFF	TRBJ2-1	1,2	TRAV5	CAESICA_SASKIIF	TRAJ3	1,37
TRBV2		CASSPSGGPDNEQFF	TRBJ2-1	1,2	TRAV19	CALTGTGAGSARQLTF	TRAJ22	1,37
TRBV6-3		CASSFDPGQGDPFNSQPQHF	TRBJ1-5	1,2	TRAV16	CALRRGSNYKLTFF	TRAJ53	1,37
TRBV4-3		CASSQGPPLRDEQFF	TRBJ2-1	1,2	TRAV24	CARNQFYF	TRAJ49	1,37
TRBV5-1		CASSSGGAGREQFF	TRBJ2-1	1,2	TRAV4	CLVSRARLMF	TRAJ31	1,37
TRBV12-3		CASQGETQYF	TRBJ2-5	1,2				
TRBV29-1		CSVEDGRGPDTEAFF	TRBJ1-1	1,2				
TRBV6-5		CASSLRQGERSPLHF	TRBJ1-6	1,2				

Annexe 7 – Composition clonotypique de la réponse LT CD8 spécifique de E18 (PS24)

PS24 B*08-E18 (Gag)

	TRBV	CDR3.aa	TRBJ	Freq	TRAV	CDR3.aa	TRAJ	Freq
EARLY	TRBV2	CASSTGTSGRGEQFF	TRBJ2-1	29,33	TRAV8-3	CAVGYTDKLI	TRAJ34	42,42
	TRBV5-1	CASSLYPGNEQYF	TRBJ2-7	22,67	TRAV8-6	CAVGYTDKLI	TRAJ34	42,42
	TRBV7-8	CASSFQGERTEAFF	TRBJ1-1	10,67	TRAV1-1	CAVSSGNTPLVF	TRAJ29	16,67
	TRBV2	CASSEAATGRSTDTQYF	TRBJ2-3	10,67	TRAV25	CAGPGGGGANNLFF	TRAJ36	6,06
	TRBV2	CASSAAVKGDTQYF	TRBJ2-3	9,33	TRAV1-2	CAVRGGIW_SARQLTF	TRAJ22	4,55
	TRBV7-9	CASSLEPPGYASDEQFF	TRBJ2-1	2,67	TRAV22	CAPTRP_NQFYF	TRAJ49	4,55
	TRBV6-1	CASSELDMRDQYF	TRBJ2-3	2,67	TRAV13-1	CAAPGGGGNKLTF	TRAJ10	3,03
	TRBV9	CASSVVGDSRETQYF	TRBJ2-5	2,67	TRAV13-1	CAASNGYSTLTF	TRAJ11	3,03
	TRBV7-8	CASSPLDGKRDQYF	TRBJ2-3	1,33	TRAV8-6	CAVSDHNDMRF	TRAJ43	3,03
	TRBV27	CASSLDRDRGLRAGELFF	TRBJ2-2	1,33	TRAV21	CAVICLR_GSEKLVF	TRAJ57	1,52
	TRBV20-1	CSARLSYEQYF	TRBJ2-7	1,33	TRAV30	CGTDSNTGNQFYF	TRAJ49	1,52
	TRBV20-1	CSARDGSRQAASEKLF	TRBJ1-4	1,33	TRAV38-1	CAFISNTDKLI	TRAJ34	1,52
	TRBV28	CASSLSQYNSPLHF	TRBJ1-6	1,33	TRAV12-2	CAGPAYSGAGSYQLTF	TRAJ28	1,52
	TRBV9	CASSVVGGRDQYF	TRBJ2-3	1,33	TRAV21	CAVDTDKLI	TRAJ34	1,52
	TRBV7-6	CASSLAGPNEQFF	TRBJ2-1	1,33	TRAV12-3	CAIVKAAGNKLF	TRAJ17	1,52
					TRAV13-1	CAATTSYDKVIF	TRAJ50	1,52
				TRAV27	CAGSSSNTGKLI	TRAJ37	1,52	
				TRAV19	CALSERGNQFYF	TRAJ49	1,52	
INT	TRBV2	CASSEAATGRSTDTQYF	TRBJ2-3	33,33	TRAV8-6	CAVGYTDKLI	TRAJ34	37,5
	TRBV5-1	CASSLYPGNEQYF	TRBJ2-7	20	TRAV8-3	CAVGYTDKLI	TRAJ34	37,5
	TRBV2	CASSAAVKGDTQYF	TRBJ2-3	16,67	TRAV8-6	CAVSDHNDMRF	TRAJ43	20,83
	TRBV2	CASSTGTSGRGEQFF	TRBJ2-1	13,33	TRAV1-1	CAVSSGNTPLVF	TRAJ29	16,67
	TRBV7-2	CASSQPLAGDGTGELFF	TRBJ2-2	3,33	TRAV13-1	CAAPGGGGNKLTF	TRAJ10	4,17
	TRBV9	CASSVVGDSRETQYF	TRBJ2-5	3,33	TRAV20	CAGGQGAQKLVF	TRAJ54	4,17
	TRBV20-1	CSARLSYEQYF	TRBJ2-7	3,33	TRAV4	CLVGPISGARSARQLTF	TRAJ22	4,17
	TRBV9	CASSVEVNTTEAFF	TRBJ1-1	3,33	TRAV30	CGTDSNTGNQFYF	TRAJ49	4,17
	TRBV30	CAWKPPD_GQETQYF	TRBJ2-5	3,33	TRAV16	CALNDNTDKLI	TRAJ34	4,17
					TRAV20	CAVRQTGANLFF	TRAJ36	4,17
LATE	TRBV9	CASSVVGDSRETQYF	TRBJ2-5	20,51	TRAV13-1	CAASMADKLI	TRAJ34	24,62
	TRBV9	CASSPLPSLYGYTF	TRBJ1-2	16,67	TRAV20	CAPSDGQKLI	TRAJ16	13,85
	TRBV20-1	CSAREGGYEQYF	TRBJ2-7	14,1	TRAV21	CAHGGGGSEKLVF	TRAJ57	12,31
	TRBV5-1	CASTPQGARGDTEAFF	TRBJ1-1	10,26	TRAV12-1	CVVEAGGTSYGKLF	TRAJ52	10,77
	TRBV7-9	CASSPPTGSYEQYF	TRBJ2-7	10,26	TRAV20	CAPDGGQKLI	TRAJ16	6,15
	TRBV20-1	CSARRDYEQYF	TRBJ2-7	3,85	TRAV8-3	CAVDNFKFYF	TRAJ21	6,15
	TRBV10-2	CASSETGGRGTEAFF	TRBJ1-1	2,56	TRAV21	CAVSPRGYKLSF	TRAJ20	1,54
	TRBV20-1	CSARQSYEQYF	TRBJ2-7	2,56	TRAV13-1	CAGNYGSSQGNLIF	TRAJ42	1,54
	TRBV7-8	CASSFQGSNQPHF	TRBJ1-5	1,28	TRAV3	CAVRDNQRANQFYF	TRAJ49	1,54
	TRBV4-3	CASSQDRPRDQYF	TRBJ2-7	1,28	TRAV38-2DV8	CAYVRGGADGLTF	TRAJ45	1,54
	TRBV4-1	CASSQPGGLSYNEQFF	TRBJ2-1	1,28	TRAV24	CACSNQAGTALIF	TRAJ15	1,54
	TRBV12-3	CASSLVHEQYF	TRBJ2-7	1,28	TRAV38-2DV8	CAYRPSGSRLLTF	TRAJ58	1,54
	TRBV2	CASSPSGGPDNEQFF	TRBJ2-1	1,28	TRAV25	CAAPSSGDYKLSF	TRAJ20	1,54
	TRBV5-6	CASSFSATDTQYF	TRBJ2-3	1,28	TRAV2	CAVTAML_NNRKLIW	TRAJ38	1,54
	TRBV4-1	CASSQVQFEDRGYGYTF	TRBJ1-2	1,28	TRAV41	CAVRGEWGSNYKLF	TRAJ53	1,54
	TRBV4-3	CASSQEDQGMGETQYF	TRBJ2-5	1,28	TRAV27	CAGHYPNQYKLSF	TRAJ20	1,54
	TRBV9	CASSVPIGTGSYNEQFF	TRBJ2-1	1,28	TRAV19	CALSETDTGNQFYF	TRAJ49	1,54
	TRBV7-3	CSGRD_GELFF	TRBJ2-2	1,28	TRAV13-2	CAENGVLLDTGRRALTF	TRAJ5	1,54
	TRBV19	CASSTSGSSYNEQFF	TRBJ2-1	1,28	TRAV20	CAVRQGGKLI	TRAJ23	1,54
	TRBV6-2	CASRRRDYEQYF	TRBJ2-7	1,28	TRAV4	CLVGPQGGKLI	TRAJ23	1,54
	TRBV20-1	CSARLSYEQYF	TRBJ2-7	1,28	TRAV19	CALSEETSNTGKLI	TRAJ37	1,54
	TRBV9	CASSVVAAGDTQYF	TRBJ2-3	1,28	TRAV13-1	CAASRSR_TYKYIF	TRAJ40	1,54
	TRBV11-3	CASSLEAS_VDTEAFF	TRBJ1-1	1,28				

Annexe 8 – Composition clonotypique de la réponse LT CD8 spécifique de KF11 (PS03) et spécifique de QK10 (PS14)

PS03 B*57-KF11 (Gag)

	TRBV	CDR3.aa	TRBJ	Freq	TRAV	CDR3.aa	TRAJ	Freq
EARLY	TRBV5-6	CASSLSSNQPHF	TRBJ1-5	73,68	TRAV14DV4	CAMRSPGNMLTF	TRAJ39	61,11
	TRBV20-1	CSAHWRTGARRETQYF	TRBJ2-5	1,75	TRAV16	CALIPKTGAGSYQLTF	TRAJ28	22,22
	TRBV4-1	CASSPRQGTYEYF	TRBJ2-7	1,75	TRAV21	CAVSGGSYIPTF	TRAJ6	2,78
	TRBV6-5	CASSYEGNSPEAFF	TRBJ1-1	1,75	TRAV12-1	CVVNNARLMF	TRAJ31	2,78
	TRBV4-2	CASSQDSGGGAFTGELFF	TRBJ2-2	1,75	TRAV21	CAVSSSGSASKIIF	TRAJ3	2,78
	TRBV4-1	CASSQEPYGTNTEAFF	TRBJ1-1	1,75	TRAV22	CAVRPFGSNKFYF	TRAJ21	2,78
	TRBV15	CATSRTARTGGYEQYF	TRBJ2-7	1,75	TRAV17	CATGDLQGGYEKLVF	TRAJ57	2,78
	TRBV12-3	CASSFSDRAETQYF	TRBJ2-5	1,75				
	TRBV6-5	CASTSQGGGYNEQFF	TRBJ2-1	1,75				
	TRBV4-1	CASSQEAGAGSPYGYTF	TRBJ1-2	1,75				
	TRBV5-1	CASIASYRFWGTNPANTGELFF	TRBJ2-2	1,75				
	TRBV7-6	CASSLQLAGGQETQYF	TRBJ2-5	1,75				
	TRBV20-1	CSAVDREKDYGYTF	TRBJ1-2	1,75				
	TRBV7-6	CASSLELAGRETQYF	TRBJ2-5	1,75				
	TRBV7-3	CASSPSTSAYNEQFF	TRBJ2-1	1,75				
	TRBV6-2	CASIMRLAGGNEQFF	TRBJ2-1	1,75				
LATE	TRBV5-6	CASSLAGDLQPHF	TRBJ1-5	81,82	TRAV14DV4	CAMRAGGTSYGKLTf	TRAJ52	84,62
	TRBV7-3	CASSLSGSGVNEQFF	TRBJ2-1	1,52	TRAV12-1	CVVTLSTGYKYIF	TRAJ40	1,92
	TRBV6-3	CASSLGYGYTF	TRBJ1-2	1,52	TRAV1-2	CAVSPSTGGFKTIF	TRAJ9	1,92
	TRBV6-3	CASSYVAGEGNQPHF	TRBJ1-5	1,52	TRAV12-1	CVVEDNYGQNFVF	TRAJ26	1,92
	TRBV30	CAWSTLQGLTGEQYF	TRBJ2-7	1,52	TRAV12-1	CVPPYNYGQNFVF	TRAJ26	1,92
	TRBV2	CASSGEGQETQYF	TRBJ2-5	1,52	TRAV14DV4	CAMRPINTGTASKLTF	TRAJ44	1,92
	TRBV7-3	CASSSLAGNEQFF	TRBJ2-1	1,52	TRAV27	CAGEDRDDKIIF	TRAJ30	1,92
	TRBV10-2	CARRDPGGVTEAFF	TRBJ1-1	1,52	TRAV26-1	CIVRVPYDKIIF	TRAJ30	1,92
	TRBV15	CATSSGLGQGGQYF	TRBJ2-7	1,52	TRAV38-2DV8	CAYRREDPGTASKLTF	TRAJ44	1,92
	TRBV30	CAWSADNRGLAFF	TRBJ1-1	1,52				
	TRBV27	CASSLGGARYEQYF	TRBJ2-7	1,52				
	TRBV6-5	CASSRTGTGSYEQYF	TRBJ2-7	1,52				
	TRBV6-2	CASSYRSGSGANVLTF	TRBJ2-6	1,52				

PS14 A*03-QK10 (Nef)

	TRBV	CDR3.aa	TRBJ	Freq	TRAV	CDR3.aa	TRAJ	Freq
LATE	TRBV7-2	CASLLITFVGHEKLFf	TRBJ1-4	30,23	TRAV12-2	CAGTNFGNEKLTf	TRAJ48	29,63
	TRBV24-1	CATSAGORLNTGELFF	TRBJ2-2	25,58	TRAV22	CAVGAMRNTNAGKSTf	TRAJ27	27,16
	TRBV28	CASSPSPGGNQETQYF	TRBJ2-5	4,65	TRAV20	CAGASGGSYIPTf	TRAJ6	4,94
	TRBV11-2	CASSLEGLQLNTEAFF	TRBJ1-1	4,65	TRAV8-6	CAVSVRDDKIIF	TRAJ30	3,7
	TRBV7-9	CASSSPVGPYYNEQFF	TRBJ2-1	2,33	TRAV14DV4	CAMRDTNSGYSTLTf	TRAJ11	2,47
	TRBV13	CASSLAEGMGTEAFF	TRBJ1-1	2,33	TRAV4	CLVGDGRDGYKLSf	TRAJ20	2,47
	TRBV20-1	CSARDRVYFSSYNSPLHF	TRBJ1-6	2,33	TRAV21	CAVVRATGANNLFF	TRAJ36	2,47
	TRBV7-8	CASSSAPWGDQETQYF	TRBJ2-5	1,16	TRAV9-2	CASGNFNKFYF	TRAJ21	2,47
	TRBV7-2	CASSTGGYDRGSYEQYF	TRBJ2-7	1,16	TRAV1-1	CAVRSDTGTASKLTf	TRAJ44	1,23
	TRBV7-6	CASSSQKASGRAVETQYF	TRBJ2-5	1,16	TRAV13-1	CAASPYNAGNMLTf	TRAJ39	1,23
	TRBV13	CASSSGTSGTQETQYF	TRBJ2-5	1,16	TRAV38-2DV8	CAYRSAGSGSYALNF	TRAJ41	1,23
	TRBV5-6	CASSLELRGDNEQFF	TRBJ2-1	1,16	TRAV26-1	CIVSPRMDSSYKLf	TRAJ12	1,23
	TRBV5-4	CASSLRGGEQYF	TRBJ2-7	1,16	TRAV1-2	CAVSHLYGQNFVF	TRAJ26	1,23
	TRBV13	CASSRAGTEARETQYF	TRBJ2-5	1,16	TRAV12-1	CVVPQGTGFQKLVF	TRAJ8	1,23
	TRBV19	CASMGQAQFF	TRBJ1-1	1,16	TRAV36DV7	CAVQQGAQKLVF	TRAJ54	1,23
	TRBV4-3	CASSQGVRLAYEQYF	TRBJ2-7	1,16	TRAV20	CAVPVMTDSWGKLF	TRAJ24	1,23
	TRBV6-5	CASSYSAGVELFF	TRBJ2-2	1,16	TRAV3	CAVRDRESDGKLLF	TRAJ16	1,23
	TRBV18	CASSPGRSEQYF	TRBJ2-7	1,16	TRAV10	CAWGDSCR_GGNKLTf	TRAJ10	1,23
	TRBV13	CASSHGSWGRDSTDTQYF	TRBJ2-3	1,16	TRAV14DV4	CAMRGLSYGNRLAF	TRAJ7	1,23
	TRBV13	CASSLSLPGELFF	TRBJ2-2	1,16	TRAV27	CAVTFASDGKLLF	TRAJ16	1,23
	TRBV20-1	CSARDPTSLGTGELFF	TRBJ2-2	1,16	TRAV22	CAVVANQGKLLF	TRAJ23	1,23
	TRBV24-1	CATSDGPGPTDTQYF	TRBJ2-3	1,16	TRAV38-1	CALGAGGSGYALNF	TRAJ41	1,23
	TRBV2	CASVWDRDQETQYF	TRBJ2-5	1,16	TRAV19	CALVGNRDKIIF	TRAJ30	1,23
	TRBV6-6	CASSTGPGSYNSPLHF	TRBJ1-6	1,16	TRAV23DV6	CAASMWDTDKLIF	TRAJ34	1,23
	TRBV19	CASSIGVGEQYF	TRBJ2-7	1,16	TRAV36DV7	CAVSPGSGAGSYQLTf	TRAJ28	1,23
	TRBV15	CATSRNREPNEKLFf	TRBJ1-4	1,16	TRAV25	CAVAGGTSYGKLTf	TRAJ52	1,23
	TRBV11-1	CASSPSRGLSSPLHF	TRBJ1-6	1,16	TRAV17	CATDAYGSGSGNLf	TRAJ42	1,23
	TRBV28	CASSFSTPNEKLFf	TRBJ1-4	1,16	TRAV16	CALSGWDTDKLIF	TRAJ34	1,23
	TRBV2	CASFVQAEETQYF	TRBJ2-5	1,16				
	TRBV6-2	CASSFTGTNEKLFf	TRBJ1-4	1,16				
	TRBV28	CASSLGRLLSSGNTIYF	TRBJ1-3	1,16				

Annexe 9 – Composition clonotypique de la réponse LT CD8 spécifique de SL9 (PS212)

PS212 A*02-SL9 (Gag)

	TRBV	CDR3.aa	TRBJ	Freq	TRAV	CDR3.aa	TRAJ	Freq	
EARLY	TRBV5-1	CASSFDSEQYF	TRBJ2-7	45,45	TRAV20	CAVHDNSGNTPLVF	TRAJ29	31,15	
	TRBV7-6	CATLPPPPYEQYF	TRBJ2-7	16,88	TRAV12-3	CAMSLFNQAGTALIF	TRAJ15	11,48	
	TRBV7-8	CASSLGEEQFF	TRBJ2-1	5,19	TRAV12-1	CVVLTGFQKLVF	TRAJ8	9,84	
	TRBV6-3	CASMSLEETQYF	TRBJ2-5	3,9	TRAV12-2	CALEGYSASKIIF	TRAJ3	4,92	
	TRBV6-2	CASMSLEETQYF	TRBJ2-5	3,9	TRAV12-2	CAVFDQGTANNLFF	TRAJ36	3,28	
	TRBV29-1	CSVKKGIHEQYF	TRBJ2-7	2,6	TRAV12-1	CVVRTDKLIF	TRAJ34	3,28	
	TRBV12-4	CASSRPGQGYTEAFF	TRBJ1-1	2,6	TRAV6	CALARGNDMRF	TRAJ43	3,28	
	TRBV12-3	CASSRPGQGYTEAFF	TRBJ1-1	2,6	TRAV9-2	CALEVNNNDMRF	TRAJ43	1,64	
	TRBV7-9	CASSPRDRREAFF	TRBJ1-1	2,6	TRAV12-1	CVVNPRSKGYNKLIF	TRAJ4	1,64	
	TRBV15	CATSGDASFGTDGYTF	TRBJ1-2	2,6	TRAV13-1	CAAPLNTNAGKSTF	TRAJ27	1,64	
	TRBV10-2	CASSVQGGHEQYF	TRBJ2-7	2,6	TRAV5	CAEDNNARLMF	TRAJ31	1,64	
	TRBV6-6	CASSRSTGGLASTDTQYF	TRBJ2-3	2,6	TRAV27	CARNLA_TGKLIIF	TRAJ37	1,64	
	TRBV7-2	CASSLGVFRQETQYF	TRBJ2-5	1,3	TRAV13-1	CAAPRGLNSGNTPLVF	TRAJ29	1,64	
	TRBV4-1	CASSQQTSEWRNTQYF	TRBJ2-3	1,3	TRAV5	CAEIPPSGGSYIPTF	TRAJ6	1,64	
	TRBV12-4	CASSYQNREVRQYF	TRBJ2-5	1,3	TRAV35	CAGEMVYSGGGADGLTF	TRAJ45	1,64	
	TRBV9	CASSPLIRVPPEAQFF	TRBJ2-1	1,3	TRAV29DV5	CAAPGRGSGQNLIF	TRAJ42	1,64	
	TRBV20-1	CSARVGGSGNTIYF	TRBJ1-3	1,3	TRAV38-1	CAFIPKGGSGARQLTF	TRAJ22	1,64	
	TRBV6-5	CASSYTVLAKNIQYF	TRBJ2-4	1,3	TRAV6	CALEKNNNAGNMLTF	TRAJ39	1,64	
	TRBV6-1	CASSSMAGAYEQYF	TRBJ2-7	1,3	TRAV13-2	CAENINTGNQYF	TRAJ49	1,64	
	TRBV19	CASSNIGHSNQPQHF	TRBJ1-5	1,3	TRAV35	CAGQLNGQNFVF	TRAJ26	1,64	
	TRBV28	CASAIQGLSQPQHF	TRBJ1-5	1,3	TRAV19	CALSEAGETSGSRLTF	TRAJ58	1,64	
	TRBV5-1	CASSPDSQSSGKTIYF	TRBJ1-3	1,3	TRAV8-4	CAVRRRLW_GSQGNLIF	TRAJ42	1,64	
					TRAV24	CAPNPDNAGNMLTF	TRAJ39	1,64	
				TRAV13-2	CAKGGP_GTALIF	TRAJ15	1,64		
INT	TRBV7-6	CATLPPPPYEQYF	TRBJ2-7	18,92	TRAV20	CAVHDNSGNTPLVF	TRAJ29	12	
	TRBV5-1	CASSFDSEQYF	TRBJ2-7	10,81	TRAV12-3	CAMSLFNQAGTALIF	TRAJ15	8	
	TRBV7-2	CASSLGVFRQETQYF	TRBJ2-5	2,7	TRAV5	CAEDNNARLMF	TRAJ31	8	
	TRBV5-1	CASSLGGGLNTEAFF	TRBJ1-1	2,7	TRAV12-1	CVVLTGFQKLVF	TRAJ8	4	
	TRBV27	CASGQSGGTYEQYF	TRBJ2-7	2,7	TRAV5	CAESSNNNDMRF	TRAJ43	4	
	TRBV6-4	CASRGSDRGTEAFF	TRBJ1-1	2,7	TRAV1-1	CAVRDRG_QQKLLF	TRAJ16	4	
	TRBV6-2	CASMSLEETQYF	TRBJ2-5	2,7	TRAV12-2	CAVNLNSGNTPLVF	TRAJ29	4	
	TRBV10-2	CASSVQGGHEQYF	TRBJ2-7	2,7	TRAV12-1	CVVPSGGYKLIIF	TRAJ4	4	
	TRBV23-1	CASSHPHAD_ESNQPHF	TRBJ1-5	2,7	TRAV12-2	CALEGYSASKIIF	TRAJ3	4	
	TRBV20-1	CSATGLAGFSSYEQYF	TRBJ2-7	2,7	TRAV21	CAVLLRPPAIQGAQLVLF	TRAJ54	4	
	TRBV7-9	CASSPRDRREAFF	TRBJ1-1	2,7	TRAV23DV6	FPGGSYIPTF	TRAJ6	4	
	TRBV7-9	CASSLPGAYEQYF	TRBJ2-7	2,7	TRAV5	CADSGAGSYQLTF	TRAJ28	4	
	TRBV2	CASSENDYEQYF	TRBJ2-7	2,7	TRAV8-3	CAVETGANNLFF	TRAJ36	4	
	TRBV20-1	CSARLRELSGNTIYF	TRBJ1-3	2,7	TRAV12-1	CVVNEFSGGYNKLIF	TRAJ4	4	
	TRBV10-3	CAISESAGTGTYEQYF	TRBJ2-7	2,7	TRAV13-1	CAASGGYKLIIF	TRAJ4	4	
	TRBV7-9	CAWTGRNTEAFF	TRBJ1-1	2,7	TRAV19	CALSEAGTNAQGTALIF	TRAJ15	4	
	TRBV24-1	CATSDASRDGYGYTF	TRBJ1-2	2,7	TRAV17	CATDSGSGYALNF	TRAJ41	4	
	TRBV20-1	CSALGTPTGANVLTFF	TRBJ2-6	2,7	TRAV1-1	CAWGGGADGLTF	TRAJ45	4	
	TRBV4-3	CASSQVSGGEGYTF	TRBJ1-2	2,7	TRAV21	CAVRLTGGQKLLTF	TRAJ10	4	
	TRBV10-1	CASSERTG_MMETQYF	TRBJ2-5	2,7	TRAV24	CALFREDSNNDMRF	TRAJ43	4	
	TRBV3-1	CASSHFHTGELFF	TRBJ2-2	2,7					
	TRBV6-2	CASSYNGPNEKLF	TRBJ1-4	2,7					
	TRBV20-1	CSASSTGKVEKLF	TRBJ1-4	2,7					
	TRBV6-6	CASSRSTGGLASTDTQYF	TRBJ2-3	2,7					
	TRBV30	CAWSSPIGWGEGTQYF	TRBJ2-5	2,7					
	TRBV19	CASSPGDGSPHFF	TRBJ1-6	2,7					
	TRBV7-9	CASSLTSGYTGELFF	TRBJ2-2	2,7					
	TRBV7-7	CASSRAVS_GPQETQYF	TRBJ2-5	2,7					
	LATE	TRBV5-1	CASSFDSEQYF	TRBJ2-7	25,81	TRAV20	CAVHDNSGNTPLVF	TRAJ29	24,07
		TRBV7-6	CATLPPPPYEQYF	TRBJ2-7	22,58	TRAV12-1	CVVRTDKLIF	TRAJ34	11,11
TRBV5-1		CASSPDSQSSGNTIYF	TRBJ1-3	6,45	TRAV12-1	CVVLTGFQKLVF	TRAJ8	11,11	
TRBV7-9		CASSPRDRREAFF	TRBJ1-1	4,84	TRAV12-2	CAVESNSGYALNF	TRAJ41	5,56	
TRBV6-6		CASSRSTGGLASTDTQYF	TRBJ2-3	4,84	TRAV12-2	CAVHSGSARQLTF	TRAJ22	3,7	
TRBV6-5		CASSQTGTSNEQFF	TRBJ2-1	3,23	TRAV5	CAESSNTGNQYF	TRAJ49	3,7	
TRBV6-4		CASSQTGTSNEQFF	TRBJ2-1	3,23	TRAV8-2	CVVSDRDKIIF	TRAJ30	3,7	
TRBV6-5		CASSPGASYEQYF	TRBJ2-7	3,23	TRAV1-1	CAWGGGADGLTF	TRAJ45	3,7	
TRBV4-1		CASSPEGSNTEAFF	TRBJ1-1	1,61	TRAV12-3	CAMSLFNQAGTALIF	TRAJ15	1,85	
TRBV6-2		CASQGRRENTEAFF	TRBJ1-1	1,61	TRAV5	CAETYSGGYKLIIF	TRAJ4	1,85	
TRBV7-2		CASSPRGGANYGYTF	TRBJ1-2	1,61	TRAV12-2	CAVFDQGTANNLFF	TRAJ36	1,85	
TRBV7-8		CASSLGEEQFF	TRBJ2-1	1,61	TRAV4	CLVGDGAGGFKTIF	TRAJ9	1,85	
TRBV7-9		CASSERRTNRDEQYF	TRBJ2-7	1,61	TRAV3	CAVRDQVENTDKLIF	TRAJ34	1,85	
TRBV15		CATSRDVFNGPQPHF	TRBJ1-5	1,61	TRAV5	CAETFNQAGTALIF	TRAJ15	1,85	
TRBV30		CAWSSPIGWGEGTQYF	TRBJ2-5	1,61	TRAV36DV7	CAAPRRIM_GSQGNLIF	TRAJ42	1,85	
TRBV20-1		CSARDTLYEQYF	TRBJ2-7	1,61	TRAV1-2	CAVRDPGAGSYQLTF	TRAJ28	1,85	
TRBV2		CASSGGGIASGTSYEQYF	TRBJ2-7	1,61	TRAV30	CGTASNTGNQYF	TRAJ49	1,85	
TRBV30		CAWRKGTGGNTIYF	TRBJ1-3	1,61	TRAV22	CAGSPLGGSEKLVF	TRAJ57	1,85	
TRBV19		CASSTIGGETEAF	TRBJ1-1	1,61	TRAV13-1	CAASMAIGFQKLVF	TRAJ8	1,85	
TRBV4-1		CASLLGTGSHEQYF	TRBJ2-1	1,61	TRAV22	CAVEIRGYQKVTFF	TRAJ13	1,85	
TRBV6-5		CASSYTVLAKNIQYF	TRBJ2-4	1,61	TRAV13-2	CAPWGTGAGSYQLTF	TRAJ28	1,85	
TRBV19		CASSSGTGNTTEAFF	TRBJ1-1	1,61	TRAV1-2	CAVRFSDGQKLLF	TRAJ16	1,85	
TRBV5-8		CASSLEGISNQPHF	TRBJ1-5	1,61	TRAV22	CAGGEGTYKYIF	TRAJ40	1,85	
TRBV27		CASRSNTIYF	TRBJ1-3	1,61	TRAV5	CAEIPPSGGSYIPTF	TRAJ6	1,85	
TRBV6-5		CASSQGGVWNQPHF	TRBJ1-5	1,61	TRAV1-1	CAGEWGKLIIF	TRAJ23	1,85	
TRBV5-1		CASSDLLNTGELFF	TRBJ2-2	1,61	TRAV3	CAVSGPSGSARQLTF	TRAJ22	1,85	

LISTE DE PUBLICATIONS SOUMISES

Article 1 :

New clonotypes contribute to rejuvenated HIV-1 specific CD8⁺ T cells in patients with 25 years of HIV infection

Eoghann WHITE^{1,2}, Laura PAPAGNO^{1,2}, Assia SAMRI², Boris HEJBLUM³, Amy RANSIER⁴, Sam DARKO⁴, Patricia RECORDON-PINSON⁵, Yasmine DUDOIT⁶, Sian LLEWELLYN-LACEY⁷, Lisa CHAKRABARTI⁸, Florence BUSEYNE⁹, David A. PRICE^{7,10}, Marie-Aline ANDREOLA⁵, Rodolphe THIEBAUT^{3,11}, Christine KATLAMA⁶, Brigitte AUTRAN², Daniel C. DOUEK⁴ and Victor APPAY^{1,2,12}

Article 2:

Type I IFN mediated induction of functionally optimal antigen specific CD8⁺ T cells in HIV infection

Mariela Cabral-Piccin; Laura Papagno; Federico Perdomo-Celis; Xavier Lahaye; Stevonn Volant; **Eoghann White**; Valérie Monceaux; Sian Llewellyn-Lacey; Rémi Fromentin; David Price; Nicolas Chomont; Nicolas Manel; Asier Saez-Cirion; Victor Appay

ARTICLE

New clonotypes contribute to rejuvenated HIV-1 specific CD8⁺ T cells in patients with 25 years of HIV infection

Short title: Renewed CD8⁺ T cell immunity in long-term HIV-1 infected people

Eoghann WHITE^{1,2}, Laura PAPAGNO^{1,2}, Assia SAMRI², Boris HEJBLUM³, Amy RANSIER⁴, Sam DARKO⁴, Patricia RECORDON-PINSON⁵, Yasmine DUDOIT⁶, Sian LLEWELLYN-LACEY⁷, Lisa CHAKRABARTI⁸, Florence BUSEYNE⁹, David A. PRICE^{7,10}, Marie-Aline ANDREOLA⁵, Rodolphe THIEBAUT^{3,11}, Christine KATLAMA⁶, Brigitte AUTRAN², Daniel C. DOUEK⁴ and Victor APPAY^{1,2,12}

¹ Univ. Bordeaux, CNRS, INSERM, Immuno ConcEpT, UMR 5164, F-33000 Bordeaux, France

² Sorbonne Université, INSERM U1135, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), 75013 Paris, France

³ Univ. Bordeaux, INSERM, Bordeaux Population Health Research Centre, U1219, Inria SISTM, F-33000 Bordeaux, France

⁴ Human Immunology Section, Vaccine Research Center, NIAID, NIH, Bethesda, Maryland, United States of America.

⁵ Univ. Bordeaux, CNRS, MFP, UMR 5234, F-33000 Bordeaux, France

⁶ Sorbonne Université, INSERM, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique (iPLESP), Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Pitié Salpêtrière Hospital, Department of Infectious Diseases, F-75013 Paris, France

⁷ Division of Infection and Immunity, Cardiff University School of Medicine, Cardiff CF14 4XN, UK

⁸ CIVIC group, Virus and Immunity Unit, Institut Pasteur, Université Paris Cité, CNRS UMR 3569, Paris, France

⁹ Unité d'Epidémiologie et Physiopathologie des Virus Oncogènes, Institut Pasteur, Université Paris Cité, CNRS UMR 3569, Paris, France

¹⁰ Systems Immunity Research Institute, Cardiff University School of Medicine, Cardiff CF14 4XN, UK

¹¹ CHU de Bordeaux, Service d'information médicale, F-33000 Bordeaux, France

¹² International Research Center of Medical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto 860-0811, Japan

Correspondence to: Victor Appay (victor.appay@immuconcept.org)

KEYWORDS

HIV-1, CD8⁺ T cells, clonotypes, ART, Ageing

ABSTRACT

Therapeutic approaches, such as the “shock and kill” strategy, aim at eradicating the HIV-1 reservoir in treated HIV-1 infected patients based on CD8⁺ T cell efficacy. Precise knowledge of the state of HIV-1-specific CD8⁺ T cells after long-term infection and treatment is crucial for such strategy success. Here, we studied the evolution of the HIV-1 specific CD8⁺ T cells response in a unique longitudinal cohort of antiretroviral treated aging HIV-1 infected patients with an average follow-up of 25 years. HIV-1-specific CD8⁺ T cells from eleven HLA compatible patients were characterized by flow cytometry to investigate their activation, differentiation and senescence state. Rather than showing signs of exhaustion or senescence, HIV-1-specific CD8⁺ T cells of long-term treated patients were characterized by a less differentiated phenotype, highlighted by the increased expression of the co-stimulatory receptor CD28. Single-cell RNAseq performed on sorted HIV-1-specific CD8⁺ T cells from two patients, revealed marked changes in clonotypic composition (i.e. TCR α/β chain identification) over time. The gene expression signature of these cells at late time points indicated early differentiation and stemness, which is reminiscent of CD8⁺ T cells associated with natural control of HIV. These phenotypic and transcriptomic changes were not due to a reversal of HIV-1-specific CD8⁺ T cell dysfunctional state, but could be explained by the appearance of new clonotypes with renewed potential. These phenotypic and transcriptomic changes were not due to a reversal of HIV-1-specific CD8⁺ T cell dysfunctional state, but were rather explained by the appearance of new clonotypes with renewed potential. This is the first evidence of improved fitness and functional potential of HIV-1 specific CD8⁺ T cells after long-term treated infection, in spite of ageing

INTRODUCTION

HIV-1 remains over years a serious public health challenge for which there is no existing vaccine or cure. Cure of HIV-1 infection entails total clearance of the HIV-1 reservoir, consisting in a pool of latently-infected cells that harbors replication competent provirus and persists indefinitely (1, 2). While total eradication of the reservoir may represent an overreaching goal, a substantial decrease of the reservoir size could represent a more realistic goal that would entail treatment-free remission without viral rebound, also known as a functional cure. To this end, current approaches have been predominantly centered around the “shock and kill” strategy, which aims at a reactivation of the reservoir through latency reversing agents (LRA) while maintaining suppressive antiretroviral therapy (ART), and the subsequent elimination of latently-reactivated cells through host cytolytic effector mechanisms predominantly relying on the HIV-1-specific CD8⁺ T cell responses (3). Harnessing specific CD8⁺ T cells is being explored to achieve HIV remission, but the quality and function of these cells is a key condition of the success of this strategy.

Numerous reports have emphasized the importance of the functional and qualitative properties of CD8⁺ T cells in the control of HIV-1 infection (4). Some rare individuals, termed “controllers”, show spontaneous control of plasma viral load without the need of ART (5). This phenotype was found to be partially mediated by virus-specific CD8⁺ T cells which displayed higher proliferative potential, polyfunctionality and HIV-1 suppressive capacity than their counterparts in the majority of individuals who naturally progress toward AIDS without treatment (termed “progressors”) (6-11). Moreover, individuals infected by HIV-2, a less pathogenic form of HIV that offers another paradigm of effective HIV control, typically display robust virus-specific CD8⁺ T cell responses (12-14). However, CD8⁺ T cell responses remain suboptimal in the vast majority of people living with HIV-1 (PLWH). During untreated chronic infection, elevated viral replication and persistent activation of CD8⁺ T cells generally lead to their exhaustion with a subsequent impaired capacity to control the infection (15-17). In addition, HIV-1 infected individuals typically show accumulation of highly differentiated CD8⁺ T cells lacking the expression of the co-receptor CD28 and expressing CD57 (18), associated with telomere shortening and reduced telomerase activity, and considered end-stage cells approaching senescence (19, 20). Overall, these CD8⁺ T cell alterations explain to some extent the host inability to control HIV-1 effectively, and may also

hinder the efficacy of immunotherapeutic approaches exploiting these cells to target the viral reservoir.

By suppressing viral replication and promoting immune reconstitution, suppressive antiretroviral therapy restores some of the cellular alterations found in HIV-1-infected individuals (21). It can notably normalize the activation, differentiation and senescence profile of total CD8⁺ T cells (22, 23). ART can also help preserving the function of HIV-specific CD8⁺ T cells, depending on the timing of treatment initiation after infection. Indeed, when ART is initiated during chronic HIV infection HIV-1-specific CD8⁺ T cells present residual dysfunctional properties (24-26). In contrast, ART initiation during acute HIV infection promotes the persistence of less differentiated HIV-1-specific CD8⁺ T cells, displaying stemness properties along with high expansion and cytotoxic potential upon recall (27, 28). Increasing evidence advocate for initiating ART as early as possible, to limit damages to immune defences including HIV-1-specific CD8⁺ T cells, and increase chances of HIV remission for PLWH. However, for many years, initiation of ART has been based on quantitative CD4 T cell numbers until the START trial results and universal recommendations to implement ART in all HIV infected individuals no matter of CD4 T cell numbers. The succes of combined ART had another challenge, ageing with HIV. Indeed, decline of immune competence related to increased age, or immunosenescence, may further affect the quality of their immune responses against HIV. Given that the potential success of immunotherapies towards HIV remission relies on the quality and function of HIV-1 specific CD8⁺ T cells, it is critical to get insights into the remaining functional potential of these cells in aging PLWH treated for a very long time. To adress this question, we studied HIV-1 specific CD8⁺ T cells in a unique cohort of 20 HIV-1 infected patients with with a nearly 30 years folllow up of HIV infection. We analyzed the phenotype and gene expression profile of rare HIV-1 specific CD8⁺ T cells using polychromatic flow cytometry and single-cell RNA sequencing. Our data reveal that very long-term ART is associated with evidence of rejuvenated HIV-1 specific CD8⁺ T cells and the emergence of new clonotypes despite patient ageing.

RESULTS

Long-term treatment and ageing of HIV-1 infected individuals

To assess the status of HIV-1 specific CD8⁺ T cells after several years of untreated and treated infection, we leveraged to a unique blood cell collection including historically cryopreserved peripheral blood mononuclear cell (PBMC) samples from the early 90s and PBMC from a recent blood draw from the same individuals. These patients were initially recruited in the Immunoco cohort, established in 1991 to study immune parameters associated with HIV-1 disease progression (29-31). The cohort enrolled 152 untreated HIV-1 infected progressors recruited between 1991 and 1992. Among these patients, 28 were still followed in our infectious disease department in Paris in 2016/2017 with a median follow-up of 25 years. For some patients, we had samples collected in the late 80s before their inclusion in the Immunoco cohort. Both historical and recent PBMC samples, defined as EARLY and LATE time points, were available from 20 of these subjects, enabling retrospective immunological analyses (Table 1). An additional historical PBMC sample (intermediate INT time point), obtained in the mid 90s, was also available for 15 of the studied individuals.

The three time points corresponded to different periods of antiretroviral treatment. Individuals were untreated at the EARLY time-point, received poorly effective monotherapy at the INT time-point, and were efficiently treated for the last 15 years with ART at the LATE time-point (Figure 1A). Following ART introduction, several individuals continued to present episodes of detectable viral replication for several years, until sustained control of the virus was generally established from 2007 onwards (Figure 1B and Figure S1). There was a median of 11.6 years between the last major episode of viral replication (defined as more than 1000 copies/mL) and the LATE time point. As a result of ART-mediated viral suppression over the years, CD4⁺ T cell counts and CD4/CD8 ratios were significantly higher at the LATE time point compared to EARLY and INT ones ($p < 0.001$, Figure 1C), highlighting successful immune reconstitution.

However, these PLWH have also aged (Figure 1D), which can be associated with changes of immunological parameters. In particular, alterations of the naive CD8⁺ T cells represent an important marker of immune ageing (20). Despite the benefit of long-term antiretroviral therapy and immune reconstitution, there was a clear contraction of the naive

CD8⁺ T cell compartment in individuals at LATE time points. Except for a few outliers, their naive CD8⁺ T cell frequency and absolute counts reached similar levels to those of older HIV-1 seronegative (>75y) and seropositive individuals (>65y) (Figure 1E). Moreover, in line with observations from young and older uninfected adults (32), naïve CD8⁺ T cells displayed evidence of telomere shortening at the LATE time point, with lengths approaching those of highly differentiated CD57⁺ memory cells (Figure 1F). Increasing age of the patients was also associated with accumulation of memory CD8⁺ T cells lacking the co-receptor CD28 or expressing the senescent marker CD57, considered as hallmarks of immune ageing (Figure 1G). Overall, these individuals are representative of people with a long history of HIV-1 infection and antiretroviral treatment, as well as people who have aged and present evidence of immune ageing.

Detectable HIV-1 specific CD8⁺ T cells from long-term treated PLWH are less differentiated

We next sought to evaluate the characteristics of HIV-1 specific CD8⁺ T cells in these patients. To this end, we used human leukocyte antigen (HLA) class-I matched tetramers to identify HIV-1 specific CD8⁺ T cells at the different time points (Figures 1A and 2A). The MHC class I background of 11 out of 20 subjects was compatible with the use of our panel of HIV-1 tetramers (Table 1). We were able to detect up to 13 different HIV-1 epitope specific CD8⁺ T cells in these individuals. Consistent with previous reports showing reduced but detectable *ex vivo* responses even after years of viral suppression (24, 33), lower frequencies of tetramer⁺ CD8⁺ T cells were found at LATE vs. EARLY time points ($p=0.05$; Figure 2B).

We then assessed the expression of a panel of markers associated with cellular differentiation (CD27, CD28 and CD45RA), activation (CD38, HLADR) and replicative senescence (CD57) to characterize these cells (Figure 2C and Figure S2). When compared to INT and EARLY cells, tetramer⁺ CD8⁺ T cells at the LATE time point showed decreased expression of CD38 ($p=0.02$ and $p=0.01$; Figure 2D), indicative of less activated cells, in line with ART suppressed viral replication. Interestingly, they also displayed decreased expression of CD57 ($p=0.11$ and $p=0.03$; Figure 2E) and increased expression of CD28 ($p=0.03$ and $p=0.04$; Figure 2F), indicating that these cells were unexpectedly less senescent and less differentiated in these people with a long-term history of HIV-1 infection. This particular phenotype is reminiscent of HIV-2 specific CD8⁺ T cells, which display robust anti-viral properties while maintaining an early-differentiated phenotype (12-14). These phenotypic

data suggest that HIV-1 specific CD8⁺ T cell populations might regain potential for proliferation, survival and possible HIV-1 suppression after years of treated infection, and despite clear signs of immune ageing. Due to the very small size of HIV-1 tetramer⁺ populations at the LATE time points (ranging from 50 to 300 cells for 10 millions cryopreserved PBMCs), we were not able to perform a direct functional characterisation of these cells. We therefore decided to exploit the power of single cell transcriptomics analyses to further examine the potential of these cells.

Transcriptomic signatures reveal rejuvenated HIV-1 specific CD8⁺ T cells in long-term treated PLWH

To determine the transcriptomic signature of HIV-1 specific CD8⁺ T cells, we selected four individuals (PS03, PS14, PS24 and PS212), for having detectable HIV-1 tetramer⁺ populations at both EARLY and LATE time points, and to cover a range of age at the LATE time point (55 to 78 years old). 100 tetramer⁺ cells from five virus-specific responses (HLA-A*02-SL9, A*03-QK10, B*08-FL8, B*08-EI8 and B*57-KF11) at both time points were indexed sorted and processed to perform single-cell RNA sequencing (scRNAseq). We used the SMARTseq approach, which, although more labour-intensive than other scRNAseq protocols, enabled us to perform whole transcriptome sequencing on rare events, and thus to accommodate the small numbers of tetramer⁺ cells at the LATE time points. The data set of two out of the four selected individuals (PS212 and PS14) did not pass quality control and were eventually discarded. Consequently, a full transcriptomic analysis was carried out on the two remaining individuals: PS24 (78yr at LATE) and PS03 (55yr at LATE).

Two distinct HIV-1 specific CD8⁺ T cell populations could be successfully sorted and sequenced from donor PS24, one targeting the Gag-derived EI8 epitope and the other the Nef-derived FL8 epitope (Figure 3A). A uniform manifold approximation and projection (UMAP) representation of the transcriptomes partitioned cells in two groups that corresponded to the EARLY and LATE time-points, without discrimination between the Gag and Nef-specific CD8⁺ T cells (Figure 3B). Data set from Gag and Nef-specific cells were therefore merged for downstream analyses and identification of genes differentially expressed at EARLY and LATE time points (Figures 3C and 3D). Among the top 142 genes enriched at EARLY were *Ly6e*, *Cemip2*, *Ifi44l*, *Ifi6*, *Riok3* and *Ifitm1*, suggestive of a type I interferon signature. EARLY cells were characterized by an overall effector-like signature (e.g. *Gzmb*, *Gzmh*, *Fgfbp2*, *Ccl4* – not shown) and showed a relative overexpression of genes associated with

inhibitory receptors (e.g. *Prdm1*, *Adgrg1*) and exhaustion (e.g. *Tox*) (Figure 3E). In contrast, LATE cells displayed increased expression of self-renewal genes (e.g. *Il7r*, *Cxcr4*) and markers of naïve or early-differentiated CD8⁺ T cells typically associated with stemness (e.g. *Gzmk*, *Ccr7*, *Sell*, *Bcl6*, *Klf2*) (Figure 3E). These findings were confirmed in donor PS03 (B*57-KF11), for which EARLY cells were similarly characterized by increased expression of interferon (e.g. *Ifi27*, *Ifi44l*, *Ifi6*, *Isg15*), inhibitory receptor (e.g. *Prdm1*, *Havcr2*) and effector-like associated genes, while LATE cells displayed additional genes involved in self-renewal (e.g. *Tcf7*, *Il7r*, *Nell2*) (Figures S3A-S3E).

To extend these findings with a more powerful approach, we subjected normalized counts to a gene set enrichment analysis (GSEA). GSEA validated our initial observations and further revealed that EARLY cells were enriched in genes associated with apoptosis and programmed cell death (Figure 3F and Figure S3F). Moreover, the gene signature of EARLY CD8⁺ T cells resembled the one of terminally differentiated KLRG1⁺ cells. Together with the expression of multiple genes coding for inhibitory receptors, this hints towards an exhausted cell profile. These signatures were lacking from LATE cells, which instead showed an enrichment in genes related to components of the protein translation machinery and early cell differentiation (Figure 3G and Figure S3F). This gene signature is usually characteristic of HIV-1 specific CD8⁺ T cells from HIV-1 infected people that can control naturally the virus (34).

Similarities between HIV-1 specific CD8⁺ T cells from long-term treated PLWH and HIV controllers

We therefore assessed if the signatures of HIV-1 specific CD8⁺ T cells from PS03 and PS24 could show similarities with those of CD8⁺ T cells from infected people with evidence of HIV control in the absence of treatment. We first compared the signatures of EARLY and LATE HIV-1 specific CD8⁺ T cells with those of HIV-1 infected progressor or controller CD8⁺ T cells from already published datasets (35). As expected, EARLY CD8⁺ T cells were comparable to CD8⁺ T cells from progressors (Figure 4A). Both groups of cells showed similar expression of genes associated with inhibitory receptors (e.g. *Adgrg1*) and IFN signalling (e.g. *Ifi44l*). In contrast, LATE CD8⁺ T cells showed a transcriptomic signature that resembled more the one of controllers, with heightened expression of genes associated with stemness (e.g. *Ccr7*, *Cxcr3*, *Nell2*) and the protein translation machinery (e.g. *Rps16*) (Figure 4B). To validate further this comparison, we sorted and performed scRNAseq on virus-

specific CD8⁺ T cells from two HIV-2 infected controllers. These cells are characterized by potent functional properties, and increased CD28 expression compared to conventional HIV-1 specific CD8⁺ T cells (Figure S4A) (12-14). Their transcriptomic profile was therefore compared with the one of EARLY and LATE HIV-1 specific CD8⁺ T cells. Principal component analysis (PCA) yielded three clusters matching each group (i.e. HIV-2, EARLY and LATE). LATE, but not EARLY, CD8⁺ T cells clustered in close proximity with HIV-2 specific CD8⁺ T cells, as well as CD28 expressing cells (Figure 4C). Unsupervised analyses of differentially expressed genes (i.e. 532 genes with FDR corrected *P* values < 0.001) yielded a clear partition of EARLY CD8⁺ T cells on one side, and LATE HIV-1 specific CD8⁺ T cells and HIV-2 specific CD8⁺ T cells from the two HIV-2 controllers on the other side (Figure S4B). Notably, these cells had in common increased expression of genes associated with early cell differentiation and stemness (i.e. *Tcf7*, *Nell2*, *Gzmk* and *Il7r*), and reduced expression of genes associated with an effector and exhausted profile, in contrast to EARLY HIV-1 specific CD8⁺ T cells (Figure 4D). This indicates that LATE and HIV-2 specific CD8⁺ T cells share a transcriptomic signature associated with stemness. Altogether, these phenotypic and transcriptomic results show that HIV-1 infected individuals, who initially displayed typical exhausted CD8⁺ T cells during uncontrolled infection, were eventually able to re-establish a population of HIV-1-specific CD8⁺ T cells harbouring characteristics associated with stemness and functional potential after long-term therapy. This observation begs the question of the origination of these cells with renewed potential: does this profile result from the adaptation of the immune response to viral escape, from the reversal of the dysfunctional status of the HIV-1-specific CD8⁺ T cells, or from the replacement of old and exhausted cells by new ones?

Long-term treated PLWH display new HIV-1 specific CD8⁺ T cell clonotypes

To address this point, we first investigated if these CD8⁺ T cell changes could coincide with the establishment of dominant viral variants in the reservoir at the LATE time point. When treatment is initiated during chronic infection, CD8⁺ T cell escape variants can indeed become dominant in the latent reservoir, indicating a complete replacement of the initially established reservoir (36). We were able to sequence the target viral epitope regions in PBMCs from six patients (PS03, PS14, PS17, PS24, PS112, PS114) showing early HIV-1-specific CD8⁺ T cell differentiation at the LATE time point. However, there was no evidence of viral evolution as epitope regions of interest remained generally unchanged between the EARLY or INT time points and at the LATE one (Figure S5). This indicates that the changes

observed in HIV-1-specific CD8⁺ T cell populations at the LATE time point were not the result of viral evolution.

We next assessed the evolution of the clonotypic composition of HIV-1 specific CD8⁺ T cells over time to examine whether the LATE “stemness” signature was associated with changes in the TCR repertoire. We identified both the TCR α and TCR β of the HIV-1 specific single CD8⁺ T cells using the scRNAseq data generated for PS24 (B*08-FL8 and B*08-EI8) and PS03 (B*57-KF11). The TCR repertoire of all three HIV-1 specific CD8⁺ T cell populations show marked changes between EARLY or INT to LATE time points. Of note, LATE cells presented new clonotypes that were absent from previous time-points. In PS24 FL8-specific CD8⁺ T cells, a TRBV5-6/TRBJ2-5 clonotype persisted throughout the 25 years of follow-up (Figure 5A and S6A). This clonotype was highly dominant at EARLY and INT time points, but no longer at the LATE time point, when a new TRBV2/TRBJ2-7 clonotype became dominant. Similarly, in PS24 EI8-specific CD8⁺ T cells, while a persistent clonotype (TRBV9/TRBJ2-5) could be identified at all time points, new dominant clonotypes (TRBV9/TRBJ1-2 and TRBV20-1/TRBJ2-7) emerged at the LATE time point (Figure 5B and S6B). In PS03 B*57-KF11 CD8⁺ T cells, the EARLY dominant TRBV5-6/TRBJ1-5 clonotype was replaced by a LATE new clonotype showing similar TRBV, TRBJ and TRAV usage, but distinct CDR3 sequence and TRAJ usage (Figure 5C and S6C). The transcriptome evolution of these three HIV-1 specific CD8⁺ T cell populations at the LATE time point was therefore concomitant to changes of their clonotypic repertoire.

Based on their presence at EARLY/INT or LATE time points, we could therefore define old and new clones in these three CD8⁺ T cell populations. We next aimed to determine whether old and new clones at the LATE time point could be differentiated based on their gene expression profile. Due to the extremely low number of cells, this analysis was only possible for the PS24 FL8-specific population (25 and 14 sorted cells for the new and old clones respectively). A sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis (sPLS-DA) highlighted a separation between the two clonotypes along the first component 1 (Figure 5D). A total of 50 variables were found to be associated with component 1 (Figure 5D). Many genes overexpressed in the old clone were associated with inhibitory receptors and exhaustion of CD8⁺ T cells, including *Cd160* (encoding for an inhibitory receptor), *Nr3c1* (encoding for a glucocorticoid receptor preferentially expressed by dysfunctional tumour infiltrating lymphocytes), *Mat2a* (encoding for an enzyme involved in methionine metabolism that drives

T cell exhaustion through production of S-adenosylmethionine) (37-39) (Figures 5E). Moreover, GSEA confirmed the enrichment of inhibitory genes and revealed that several pathways previously associated with EARLY CD8⁺ T cells were still enriched in the old clone at the LATE time point, notably gene signatures associated with “Terminal exhaustion”, “apoptosis” and the “p53 pathway”, and IFN signalling (Figure 5F). These data suggest that the old clone has kept characteristics of worn-out cells, even at the LATE time point, contrary to the new clone, which rather displays a naive and central memory cell like gene signature (Figure 5F). Owing to the indexed sorting of single CD8⁺ T cells for RNAseq, we could trace back the phenotype of the old and new clones, in particular to see whether they may be differentiated based on CD28 expression, our initial parameter of evolution over time. We found that new clones expressed in general more CD28 than old ones in both PS24 and PS03 (Figure 5G). Altogether, the findings indicate that the improved condition of HIV-1 specific CD8⁺ T cell populations observed at the LATE time point is not due to the functional recovery of old clones, but rather to the emergence of new HIV-1 specific clones with features associated with early differentiation and stemness.

DISCUSSION

In the present work, we studied the evolution of HIV-1 specific CD8⁺ T cells using a unique cell collection from PLWH with a very long infection history. After more than 25 years of natural and treated HIV-1 infection, we could detect the presence of rare HIV-1 specific CD8⁺ T cells. These cells, rather than showing expected marks of exhaustion or senescence, displayed characteristics associated with early differentiation and stemness at the phenotypic and transcriptomic levels. In particular, they were characterized by increased expression of CD28 indicating early stages of T cell differentiation (40). CD28 is a major co-stimulatory receptor, responsible for optimal antigen-mediated activation, proliferation and survival of T cells (41); its loss is instead an established marker of T cell ageing (42, 43). In line with the evidence of early differentiation and fading traits of T cell exhaustion, *tcf7*, which encodes for TCF-1, was upregulated in HIV-1 specific CD8⁺ T cells of long-term treated PLWH. TCF-1 is a critical regulator of differentiation and persistence of memory CD8⁺ T cells (44) whose intracellular expression is associated with stemness potential, considered as essential for long-term CD8⁺ T cell efficacy in infectious or malignant disease settings (45). High TCF-1 expression was reported in HIV-1 specific CD8⁺ T cells from both HIV-1 and SIV controllers, and was associated with lower viral load in viremic individuals (26, 46, 47). In patients who initiated ART during acute HIV infection, a less differentiated phenotype and superior expansion capacity of HIV-1-specific CD8⁺ T cells correlated with stemness, measured by TCF-1 expression (28). Overall, the profile observed in LATE HIV-1 specific CD8⁺ T cells is in line with some form of rejuvenation of these cells after decades of treated infection.

Despite the small number of patients and cells studied in the present work, the simultaneous characterization of both gene expression signature and TCR sequence at the single cell level enabled us to get insights into this process of apparent rejuvenation. Our data suggest that characteristics of early differentiation and stemness of HIV-1 specific CD8⁺ T cells in long-term treated patients, was not due to a reversal of their initially exhausted condition, but rather to the appearance and expansion of new clonotypes. Old clones present during the first years of infection and displaying differentiated and exhausted profiles tended to disappear, and could be replaced by new clones with the original functional potential. Owing to long-term ART-mediated viral suppression, it is likely that low antigen load due to low grade viral replication or blips, in a context of full immune reconstitution, resulted in the

priming of new HIV-1 specific CD8⁺ T cells displaying optimal functional attributes, similarly to what is observed in natural controllers. The clonotypic composition of virus-specific responses is a critical determinant of anti-viral efficacy (48), so the emergence of dominant clones with renewed functional capacity likely changes the potential of HIV-1 specific CD8⁺ T cells to control the virus and target its reservoir in these patients.

Our study presents a number of limitations. Since we could eventually perform immunological studies only on eleven remaining patients of the initial cohort, the sample size remains small. Moreover, we could generate complete longitudinal transcriptomic analyses only on two individuals. Although our data represent first evidence supporting a renewed state of HIV-1 specific CD8⁺ T cells after very long-term therapy, validation using other cohorts with 25 years or more hindsight will be necessary to generalize our observations. Due to the extremely low number of tetramer⁺ cells detectable after 25 years of treated infection, we were limited to performing phenotypic and transcriptomic analyses of HIV-1 specific CD8⁺ T cells, but could not perform suitable functional studies of these cells. The question remains therefore whether long-term treatment has enabled the restoration of HIV-1 specific CD8⁺ T cell responses with genuine anti-viral efficacy, or if these cells are simply resting but functionally worthless. We can only speculate that these cells are effective at suppressing the virus and controlling HIV-1 replication, like their counterparts in HIV-1 or HIV-2 controllers. While it is unlikely that numbers of these cells may be sufficient to control viral rebound if patients were to halt their antiretroviral treatment, the presence of these cells with renewed potential is nonetheless a promising sign that exploiting or boosting them using interventional approaches could yield the generation of effective immune responses towards HIV remission in long-term treated patients.

Remarkably, replacement of exhausted or senescent CD8⁺ T cell clones by newly generated ones occurred in PLWH who have aged significantly. For instance, PS24, one of the two patients for whom we could perform a thorough analysis, was 78 years old at the time of the last sampling. With advanced age, people experience immune ageing, which can be further accentuated by HIV-1 infection. It is well established that HIV-1 infected people even on ART exhibit sustained immune dysfunction, which is reminiscent of old age (49-51). Phenotypically, the accumulation of highly differentiated CD28⁻/CD57⁺ memory T cells is commonly observed in HIV-1 infected patients and in old uninfected people. Decline of primary immune resources including naive T cells and CD34⁺ hematopoietic progenitors is

key in linking HIV-1 pathogenesis and ageing, and is a presumed cause of reduced immune responsiveness (52). In old PLWH, both advanced age and HIV-1 infection represent a particular burden for the immune system, whose efficacy is undoubtedly decreasing. However, the replacement of old cells by newly generated clones in these patients is evidence of the resilience capacity of cellular immunity despite ageing, which has implications even beyond the context of HIV-1 infection.

METHODS

Subjects

One-hundred and fifty-two HIV-1 infected patients were enrolled in a prospective analysis of HIV-specific CTL between 1988 and 1993 and were followed until December 1996. HIV seropositivity was confirmed on positive ELISA and Western blot. All patients signed an informed consent and the protocol was accepted by an ethical committee. Exclusion criteria were: age below 18 years; haemophilia; continuing injecting drug abuse; and treatment with protease inhibitors. Antiretroviral therapies (mono or bitherapy by nucleoside analogues from November 1991 to March 1996) were started or maintained according to local clinical practice. Routine evaluation of CD4 cell counts and of other clinical parameters was performed every 2–3 months. 28 of these patients were still followed in our infectious disease department in Paris in 2016/2017 with a median follow-up of 25 years and efficiently treated for the last 15 years. Blood samples were collected for evaluation of HIV-specific T cell responses. The use of blood products from anonymized HIV-1 infected participants heal was approved by the Comité de Protection des Personnes of the Pitié-Salpêtrière Hospital (Paris, France).

Flow Cytometry and reagents

MHC class I tetramers conjugated to Streptavidin, R-Phycoerythrin conjugate (SAPE, ThermoFischer Scientific) were used to detect HIV-specific CD8 T cells with the following specificities: SLYNTVATL (SL9/HLA-A*0201), QVPLRPMTYK (QK10/HLA-A*0301), RLRPGGKKKY (RY10/HLA-A*0301), EIYKRWII (EI8/HLA-B*0801), FLKEKGGL (FL8/HLA-B*0801), KAFSPEVIPMF (KF11/HLA-B*5701) and TSTLQEQIGW (B57 TW10/HLA-B*5701). PBMCs were stained with LIVE/DEAD Fixable Aqua (ThermoFischer Scientific) for 10 minutes at room temperature, stained with tetramer-PE for 15 minutes at 37°C, stained with a cocktail of directly conjugated antibodies for 15 minutes at room temperature and fixed in 1% of paraformaldehyde (Fisher Scientific). Directly conjugated antibodies included CD8 (APC-Cy7, BD Biosciences), CD4 (BV650, BD Biosciences), CD45RA (V450), CD27 (AF700, Ozyme), CD28 (PE-CF594, BD Biosciences), CD95 (FITC), CD38 (APC), HLA-DR (PerCP-Cy5.5), CD57 (BV605). Cells were analyzed on a LSRFortessa Cell Analyzer (BD Biosciences) and data were analyzed using FlowJo software (version 10.8, BD Life Sciences).

Telomere length measurement

Measures of telomere length was performed as previously described (32). Briefly, genomic DNA (gDNA) was extracted from sorted cells with the QIAmp DNA Mini kit (QIAGEN®, France), and quantified using NanoDrop 2000. Relative telomere length (RTL) was measured as the ratio of standard DNA quantities for telomere template (T) over single copy gene 36B4 (S) determined using quantitative real-time polymerase chain reactions (qPCR) from 2ng of gDNA. qPCR were performed on a 7300 Bio-Rad Thermal cycler. To convert the ratio of starting quantity into telomere length in base pairs, a serial dilution of DNA samples from 293T cell line was run simultaneously in classical southern blot and qPCR.

Single-cell RNA sequencing

HIV-specific CD8 T cells were indexed sorted into 96-well microtiter plates containing lysis buffer (Takara) using a BD FACSAria II cell sorter (BD Biosciences) and snap frozen. RNA-seq libraries were prepared following the SMART-Seq v4 Ultra Low input RNA kit protocol. 3' SMART-Seq CDS (oligo-dt) primers were hybridized to the poly(A) tail of mRNA and reverse transcribed. cDNA was pre-amplified and indexed using the Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina). The libraries were pooled, quantified and sequenced across 150 base pairs (bp) using a paired-end strategy on a Hi-seq 3000 (Illumina).

scRNAseq data processing

Generated Fastq files were aligned to hg38 using STAR software (v.2.7.0). Aligned files were pooled and imported in R. Quality control (QC) was performed with scater (v.1.20.1) using the following QC metrics: library size, number of expressed features and proportion of reads mapped to the mitochondrial genome (53). Outliers cells were identified for each QC metrics based on the absolute median deviation (MAD) from the median value of each metrics across all cells. Cells with values above 3 MADs from the median were considered outliers and discarded. Fix threshold were also used : cells expressing more than 5000 genes and less than 500 genes were discarded. Altogether, 230, 73 and 123 cells were retained for PS24, PS03 and HIV-2 specific CD8 T cells respectively. Retained cells were normalized using the scran (v.1.20.1) package which implements the deconvolution strategy for scaling normalization (54). Differential expressed genes were detected with the *FindMarkers* function (scran) using a Wilcoxon test with a cutoff of FDR-corrected *P* value < 0.05. Violin plot were generated using the *VlnPlot* function from Seurat (v.4.1.1). Heatmap and volcano plot were generated using the *pheatmap* (v.1.0.12) and *ggplot2* (v.3.3.6) packages. GSEA was performed using the

software developed by the Broad Institute (55) . sPLS-DA was performed as previously described (56) .

Clonotype analysis

Fastq files were processed for TRB and TRA sequence annotation using MiXCR (v.3.0.13) with parameters `-s has -p rna-seq -OallowPartialAlignments=true`. TRB and TRA repertoire were then imported into R for visualization using the immunarch (v.0.7.0) package.

PCR amplification and Sanger sequencing of Gag and Nef

Viral DNA was extracted from patient total PBMCs at different time points. Gag and Nef were amplified starting from extracted DNA using primers previously described (57) and Taq Polymerase ThermoStar® 2 (Eurobio). PCR products were sequenced on both strands using an Applied Biosystems 3500 xls Dx Genetic Analyzer and primers from the second PCR.

Statistics for nonsequencing data

Statistical analyses were performed using the nonparametric Mann-Whitney test (2 groups) for group comparisons, and the Wilcoxon matched-pairs signed-rank test for the longitudinal samples before and after ART initiation. The nonparametric Spearman test was used for all of the correlation analyses. Original data unit from available data was used for all statistical analysis and no logarithm transformation was performed. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 9 et R. $P < 0.05$ was considered significant.

Data availability

This study includes no data deposited in external repositories. All data reported in this paper will be shared by the lead contact upon request.

FUNDING SOURCES

This work was funded by INSERM and by grants from the ANRS (2016-A00400-51) and the ANR (14CE16002901), and by a Senior IdEx Chair of the University of Bordeaux (France). EW is a laureate of doctoral contracts from Sorbonne University and Sidaction.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors have no conflict of interest to declare.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

E.W. designed and performed experiments, analyzed data, and wrote the manuscript. L.P. designed and performed experiments, analyzed data, and wrote the manuscript. A.S. analyzed data and provided samples. B.H. analyzed data. A.R. performed experiments. S.D. analyzed data. P.R.P. designed and performed experiments. Y.D. analyzed data and provided samples. S.L.L. provided reagents. L.C. conceived the study and acquired funding. F.B. provided samples. D.A.P. provided reagents and wrote the manuscript. M.A.A. designed experiments. R.T. analyzed data. C.K. analyzed data and provided samples. B.A. conceived the study. D.C.D. designed experiments and provided reagents. V.A. conceived and supervised the study, designed experiments, analyzed data, acquired funding, and wrote the manuscript.

REFERENCES

1. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, et al. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*. 1997;278(5341):1295-300.
2. Wong JK, Hezareh M, Gunthard HF, Havlir DV, Ignacio CC, Spina CA, et al. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science*. 1997;278(5341):1291-5.
3. Hamer DH. Can HIV be Cured? Mechanisms of HIV persistence and strategies to combat it. *Curr HIV Res*. 2004;2(2):99-111.
4. Appay V, Douek DC, and Price DA. CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nat Med*. 2008;14(6):623-8.
5. Saez-Cirion A, Pancino G, Sinet M, Venet A, and Lambotte O. HIV controllers: how do they tame the virus? *Trends Immunol*. 2007;28(12):532-40.
6. Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood*. 2006;107(12):4781-9.
7. Almeida JR, Price DA, Papagno L, Arkoub ZA, Sauce D, Bornstein E, et al. Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J Exp Med*. 2007;204(10):2473-85.
8. Migueles SA, Osborne CM, Royce C, Compton AA, Joshi RP, Weeks KA, et al. Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity*. 2008;29(6):1009-21.
9. Saez-Cirion A, Lacabaratz C, Lambotte O, Versmisse P, Urrutia A, Boufassa F, et al. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(16):6776-81.
10. Almeida JR, Sauce D, Price DA, Papagno L, Shin SY, Moris A, et al. Antigen sensitivity is a major determinant of CD8+ T-cell polyfunctionality and HIV-suppressive activity. *Blood*. 2009;113(25):6351-60.
11. Hersperger AR, Pereyra F, Nason M, Demers K, Sheth P, Shin LY, et al. Perforin expression directly ex vivo by HIV-specific CD8 T-cells is a correlate of HIV elite control. *PLoS pathogens*. 2010;6(5):e1000917.
12. Duvall MG, Precopio ML, Ambrozak DA, Jaye A, McMichael AJ, Whittle HC, et al. Polyfunctional T cell responses are a hallmark of HIV-2 infection. *Eur J Immunol*. 2008;38(2):350-63.
13. Leligidowicz A, Onyango C, Yindom LM, Peng Y, Cotten M, Jaye A, et al. Highly avid, oligoclonal, early-differentiated antigen-specific CD8+ T cells in chronic HIV-2 infection. *Eur J Immunol*. 2010;40(7):1963-72.
14. Angin M, Wong G, Papagno L, Versmisse P, David A, Bayard C, et al. Preservation of Lymphopoietic Potential and Virus Suppressive Capacity by CD8+ T Cells in HIV-2-Infected Controllers. *J Immunol*. 2016;197(7):2787-95.
15. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*. 2006;443(7109):350-4.
16. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2011;12(6):492-9.
17. Buggert M, Tauriainen J, Yamamoto T, Frederiksen J, Ivarsson MA, Michaelsson J, et al. T-bet and Eomes are differentially linked to the exhausted phenotype of CD8+ T cells in HIV infection. *PLoS pathogens*. 2014;10(7):e1004251.

18. Papagno L, Spina CA, Marchant A, Salio M, Rufer N, Little S, et al. Immune Activation and CD8(+) T-Cell Differentiation towards Senescence in HIV-1 Infection. *PLoS Biol.* 2004;2(2):E20.
19. Lichterfeld M, Mou D, Cung TD, Williams KL, Waring MT, Huang J, et al. Telomerase activity of HIV-1-specific CD8+ T cells: constitutive up-regulation in controllers and selective increase by blockade of PD ligand 1 in progressors. *Blood.* 2008;112(9):3679-87.
20. Appay V, and Sauce D. Assessing immune aging in HIV-infected patients. *Virulence.* 2017;8(5):529-38.
21. Jain V, Hartogensis W, Bacchetti P, Hunt PW, Hatano H, Sinclair E, et al. Antiretroviral therapy initiated within 6 months of HIV infection is associated with lower T-cell activation and smaller HIV reservoir size. *J Infect Dis.* 2013;208(8):1202-11.
22. Behrens NE, Wertheimer A, Klotz SA, and Ahmad N. Reduction in terminally differentiated T cells in virologically controlled HIV-infected aging patients on long-term antiretroviral therapy. *PLoS One.* 2018;13(6):e0199101.
23. Perdomo-Celis F, Taborda NA, and Rugeles MT. CD8(+) T-Cell Response to HIV Infection in the Era of Antiretroviral Therapy. *Front Immunol.* 2019;10:1896.
24. Appay V, Hansasuta P, Sutton J, Schrier RD, Wong JK, Furtado M, et al. Persistent HIV-1-specific cellular responses despite prolonged therapeutic viral suppression. *Aids.* 2002;16(2):161-70.
25. Migueles SA, Weeks KA, Nou E, Berkley AM, Rood JE, Osborne CM, et al. Defective human immunodeficiency virus-specific CD8+ T-cell polyfunctionality, proliferation, and cytotoxicity are not restored by antiretroviral therapy. *J Virol.* 2009;83(22):11876-89.
26. Rutishauser RL, Deguit CDT, Hiatt J, Blaeschke F, Roth TL, Wang L, et al. TCF-1 regulates HIV-specific CD8+ T cell expansion capacity. *JCI Insight.* 2021;6(3).
27. Oxenius A, Price DA, Easterbrook PJ, O'Callaghan CA, Kelleher AD, Whelan JA, et al. Early highly active antiretroviral therapy for acute HIV-1 infection preserves immune function of CD8+ and CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(7):3382-7.
28. Takata H, Kakazu JC, Mitchell JL, Kroon E, Colby DJ, Sacdalan C, et al. Long-term antiretroviral therapy initiated in acute HIV infection prevents residual dysfunction of HIV-specific CD8(+) T cells. *EBioMedicine.* 2022;84:104253.
29. Chouquet C, Autran B, Gomard E, Bouley JM, Calvez V, Katlama C, et al. Correlation between breadth of memory HIV-specific cytotoxic T cells, viral load and disease progression in HIV infection. *Aids.* 2002;16(18):2399-407.
30. Haas G, Samri A, Gomard E, Hosmalin A, Duntze J, Bouley JM, et al. Cytotoxic T-cell responses to HIV-1 reverse transcriptase, integrase and protease. *AIDS.* 1998;12(12):1427-36.
31. Kousignian I, Autran B, Chouquet C, Calvez V, Gomard E, Katlama C, et al. Markov modelling of changes in HIV-specific cytotoxic T-lymphocyte responses with time in untreated HIV-1 infected patients. *Stat Med.* 2003;22(10):1675-90.
32. Fali T, Papagno L, Bayard C, Mouloud Y, Boddaert J, Sauce D, et al. New Insights into Lymphocyte Differentiation and Aging from Telomere Length and Telomerase Activity Measurements. *J Immunol.* 2019;202(7):1962-9.
33. Addo MM, Yu XG, Rathod A, Cohen D, Eldridge RL, Strick D, et al. Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *J Virol.* 2003;77(3):2081-92.

34. Buggert M, Nguyen S, Salgado-Montes de Oca G, Bengsch B, Darko S, Ransier A, et al. Identification and characterization of HIV-specific resident memory CD8(+) T cells in human lymphoid tissue. *Sci Immunol*. 2018;3(24).
35. Quigley M, Pereyra F, Nilsson B, Porichis F, Fonseca C, Eichbaum Q, et al. Transcriptional analysis of HIV-specific CD8+ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nat Med*. 2010;16(10):1147-51.
36. Deng K, Perteua M, Rongvaux A, Wang L, Durand CM, Ghiaur G, et al. Broad CTL response is required to clear latent HIV-1 due to dominance of escape mutations. *Nature*. 2015;517(7534):381-5.
37. Bozorgmehr N, Okoye I, Oyegbami O, Xu L, Fontaine A, Cox-Kennett N, et al. Expanded antigen-experienced CD160(+)CD8(+)effector T cells exhibit impaired effector functions in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunother Cancer*. 2021;9(4).
38. Acharya N, Madi A, Zhang H, Klapholz M, Escobar G, Dulberg S, et al. Endogenous Glucocorticoid Signaling Regulates CD8(+) T Cell Differentiation and Development of Dysfunction in the Tumor Microenvironment. *Immunity*. 2020;53(3):658-71 e6.
39. Hung MH, Lee JS, Ma C, Diggs LP, Heinrich S, Chang CW, et al. Tumor methionine metabolism drives T-cell exhaustion in hepatocellular carcinoma. *Nat Commun*. 2021;12(1):1455.
40. Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, et al. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med*. 2002;8(4):379-85.
41. Weng NP, Akbar AN, and Goronzy J. CD28(-) T cells: their role in the age-associated decline of immune function. *Trends Immunol*. 2009;30(7):306-12.
42. Effros RB, Allsopp R, Chiu CP, Hausner MA, Hirji K, Wang L, et al. Shortened telomeres in the expanded CD28-CD8+ cell subset in HIV disease implicate replicative senescence in HIV pathogenesis. *Aids*. 1996;10(8):F17-22.
43. Vallejo AN, Bryl E, Klarskov K, Naylor S, Weyand CM, and Goronzy JJ. Molecular basis for the loss of CD28 expression in senescent T cells. *J Biol Chem*. 2002;277(49):46940-9.
44. Zhou X, Yu S, Zhao DM, Harty JT, Badovinac VP, and Xue HH. Differentiation and persistence of memory CD8(+) T cells depend on T cell factor 1. *Immunity*. 2010;33(2):229-40.
45. Zehn D, Thimme R, Lugli E, de Almeida GP, and Oxenius A. 'Stem-like' precursors are the fount to sustain persistent CD8(+) T cell responses. *Nat Immunol*. 2022;23(6):836-47.
46. Passaes C, Millet A, Madelain V, Monceaux V, David A, Versmisse P, et al. Optimal Maturation of the SIV-Specific CD8(+) T Cell Response after Primary Infection Is Associated with Natural Control of SIV: ANRS SIC Study. *Cell reports*. 2020;32(12):108174.
47. Angin M, Volant S, Passaes C, Lecuroux C, Monceaux V, Dillies MA, et al. Metabolic plasticity of HIV-specific CD8(+) T cells is associated with enhanced antiviral potential and natural control of HIV-1 infection. *Nat Metab*. 2019;1(7):704-16.
48. Lissina A, Chakrabarti LA, Takiguchi M, and Appay V. TCR clonotypes: molecular determinants of T-cell efficacy against HIV. *Current opinion in virology*. 2016;16:77-85.
49. Appay V, and Kelleher AD. Immune activation and immune aging in HIV infection. *Current opinion in HIV and AIDS*. 2016;11(2):242-9.
50. Babu H, Ambikan AT, Gabriel EE, Svensson Akusjarvi S, Palaniappan AN, Sundaraj V, et al. Systemic Inflammation and the Increased Risk of Inflamm-Aging and Age-

- Associated Diseases in People Living With HIV on Long Term Suppressive Antiretroviral Therapy. *Front Immunol.* 2019;10:1965.
51. Lagathu C, Cossarizza A, Bereziat V, Nasi M, Capeau J, and Pinti M. Basic science and pathogenesis of ageing with HIV: potential mechanisms and biomarkers. *AIDS.* 2017;31 Suppl 2:S105-S19.
 52. Appay V, Fastenackels S, Katlama C, Ait-Mohand H, Schneider L, Guihot A, et al. Old age and anti-cytomegalovirus immunity are associated with altered T-cell reconstitution in HIV-1-infected patients. *Aids.* 2011;25(15):1813-22.
 53. McCarthy DJ, Campbell KR, Lun AT, and Wills QF. Scater: pre-processing, quality control, normalization and visualization of single-cell RNA-seq data in R. *Bioinformatics.* 2017;33(8):1179-86.
 54. Lun AT, Bach K, and Marioni JC. Pooling across cells to normalize single-cell RNA sequencing data with many zero counts. *Genome Biol.* 2016;17:75.
 55. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(43):15545-50.
 56. Le Cao KA, Boitard S, and Besse P. Sparse PLS discriminant analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. *BMC Bioinformatics.* 2011;12:253.
 57. Papuchon J, Pinson P, Lazaro E, Reigadas S, Guidicelli G, Taupin JL, et al. Resistance mutations and CTL epitopes in archived HIV-1 DNA of patients on antiviral treatment: toward a new concept of vaccine. *PLoS One.* 2013;8(7):e69029.

TABLE & FIGURE LEGENDS

Table 1 – Clinical characteristics of study participants

Figure 1 – Infection history and ageing of long-term treated PLWH.

(A) Graphical representation of the experimental set-up. (B) Evolution of the viral load (RNA copies/mL) in four representative patients from February 1996 to October 2017. EARLY, INT and LATE time-points are highlighted in red, orange and blue respectively. (C) Absolute CD4 T cell counts at the studied time-points (expressed in cell/mm³; EARLY n = 14, INT n = 15, LATE n = 20) and CD4/CD8 ratio (EARLY n = 9, INT n = 10, LATE n = 20). *P* values were determined using the Mann-Whitney test. Each dot represents one donor. Bars indicates the median. (D) Age of individuals from the IMMUNOCO cohort at studied time-point (EARLY n = 20, INT n = 15, LATE n = 20) (E) Percentage of naïve CD8⁺ T cells within total CD8⁺ T cells (left; EARLY n = 20, INT n = 15, LATE n = 18, >65yr OLD HIV n = 14, and >75yr Healthy Donor n = 20) and absolute counts of naïve CD8⁺ T cells (right; EARLY n = 9, INT n = 10, LATE n = 18, >65yr OLD HIV n = 13, and >75yr Healthy Donor n = 18). *P* values were determined using the Mann-Whitney test. Each dot represents one donor. Bars indicates the median. (F) Telomere length in FACS sorted naïve and CD57⁺ memory CD8⁺ T cell subsets from young infected adults (25-40yr old, n=10) and individuals from the IMMUNOCO cohort (EARLY n = 10, INT n = 9, LATE n = 10). *P* values were determined using the Mann-Whitney test. Each dot represents one donor. Bars indicates the median. (G) Expression of CD28 and CD57 on total CD8⁺ T cells at LATE time-point were plotted as a function of age. Correlations were determined using the Spearman's rank test.

Figure 2 – Phenotypic analysis of HIV-1 specific CD8⁺ T cell activation, differentiation and senescence.

(A) Representative staining of B*08-EI8 specific CD8⁺ T cells at EARLY, INT and LATE time-points (subject PS24). (B) Percentage of tetramer⁺ CD8⁺ T cells at each time-point. EARLY n =21, INT n = 11 and LATE n = 21. *P* values were determined using the Mann-Whitney test. Each dot represents a distinct tetramer⁺ population. Bars indicates the median. (C) Representative staining for the expression of cell surface markers on total and HIV-specific CD8⁺ T cells (PS24 subject). (D-F) Quantification of CD38, CD57 and CD28 expression on tetramer⁺ CD8⁺ T cells. *P* values were determined using the Mann-Whitney

test. Each dot represents a distinct tetramer⁺ population. Bars indicates the median. EARLY n = 11, INT n = 6, LATE n = 8.

Figure 3 – Transcriptomic analysis of HIV-1 specific CD8⁺ T cells.

(A) Dot plots showing B*08-FL8 and B*08-EI8 specific CD8⁺ T cell responses from individual PS24 at EARLY and LATE time-points. **(B)** UMAP projection of tetramer⁺ CD8⁺ T cells. Each dot represents one cell. Each cell was color-coded based on time-point (left) or specificity (right). **(C)** Volcano plot showing differentially expressed genes between EARLY and LATE (blue: upregulated at LATE, red: upregulated at EARLY). The x axis represents log fold change and y axis represents $-\log_{10}$ adjusted *P* values. **(D)** Heatmap of the top 229 differentially expressed genes between EARLY and LATE as defined in (C). Significativity was assessed using a Wilcoxon unpaired test. **(E)** Violin plots of genes associated with exhaustion and inhibition (top panel), IFN signalling (middle panel) and stemness (bottom panel) of CD8⁺ T cells. The violin represents the probability density at each value. Each dot represents one cell. Significativity was assessed using a Wilcoxon unpaired test. FDR-adjusted *P* values are reported (* *P* < 0.05, ** *P* < 0.01, *** *P* < 0.001, **** *P* < 0.0001). **(F)** GSEA showing the enrichment of genes associated with IFN signature, co-inhibitory molecules, apoptosis, stabilization of p53 and effector signature among EARLY cells. Normalized enrichment scores and adjusted *P* values are indicated. **(G)** GSEA showing the enrichment of genes associated with translation and a central memory signature among LATE cells.

Figure 4 – Gene signature comparison between CD8⁺ T cells from long-term treated PLWH and HIV controllers

(A) GSEA showing the enrichment of genes associated with HIV-1 progressors among EARLY cells from individuals PS03 and PS24. Normalized enrichment scores and adjusted *P* values are indicated. **(B)** GSEA showing the enrichment of genes associated with HIV-1 controllers among LATE cells from individuals PS03 and PS24. **(C)** PCA plots using EARLY and LATE cells from PS03 along with HIV-2 specific CD8⁺ T cell samples to show the segregation between HIV-2/LATE versus EARLY cells (left panel) and their overlap according to CD28 expression (right panel). **(D)** Heatmap representation of the genes differentially expressed between EARLY and LATE HIV-1 specific CD8⁺ T cells from PS03 and HIV-2 specific CD8⁺ T cells.

Figure 5 – Clonotypic evolution of HIV-1 specific CD8⁺ T cells responses.

(A-C) Evolution of the clonotypic composition of PS24 B*08-FL8, PS24 B*08-EI8 and PS03 B*57-KF11 specific CD8⁺ T cell responses. Top panel shows CDR3 region of the TCR beta chain and bottom panel shows CDR3 region of the TCR alpha chain. Each color represents a distinct CDR3 sequence. Same color was applied to paired beta and alpha chains. Solid and dashed lines represents new and old clones respectively. **(D)** Segregation of PS24 B*08-FL8 old (violet) and new (orange) clones at the LATE time point based on their gene expression profile. Left panel: Sample representation of the two clonotypes using the first two components of sPLS-DA. Right panel: Projection of sPLS-DA selected variables on correlation circles. **(E)** Heatmap representation of the genes differentially expressed between the two clones as defined in (D). Highlighted genes are involved in T cell exhaustion or inhibition. **(F)** GSEA showing enrichment of genes associated with terminal exhaustion, p53 pathway, co-inhibitory molecules, IL6-JAK/STAT3 signaling and negative regulation of immune response in the old clone (violet) or with naïve and central memory signature in the new clone (orange) of PS24 B*08-FL8 specific CD8⁺ T cells at the LATE time point. **(G)** Quantification of CD28 expression on old and new clones from PS24 and PS03 HIV specific CD8⁺ T cells, as defined in A-C. Number of cells analysed and percentages of CD28 expression for each clone are indicated.

SUPPLEMENTAL FIGURES

SUPPLEMENTAL FIGURE 1 - Evolution of viral load and CD4 counts of study participants.

The viral load (dashed line, copies/mL) and CD4 counts (solid line, cells/mm³) of each individual from the IMMUNOCO cohort are shown throughout the follow-up. Red, orange and blue lines indicate the EARLY, INT and LATE time-point respectively.

SUPPLEMENTAL FIGURE 2 - Additional phenotypic markers on tetramer⁺ CD8⁺ T cells.

Quantification of CD27, HLA-DR and CD45RA expression on tetramer⁺ CD8⁺ T cells. Each dot represents a distinct tetramer⁺ population. *P* values were determined using the Mann-Whitney test. Bars indicates the median. EARLY n = 11, INT n = 6, LATE n = 8.

SUPPLEMENTAL FIGURE 3 - Transcriptomic analysis of KF11-specific CD8⁺ T cells in PS03.

(A) Dot plots showing the B*57-KF11 specific CD8 T cell response from individual PS03 at EARLY and LATE. **(B)** UMAP projection of KF11-specific CD8 T cells. Each point represents one cell. Each cell was color-coded based on the time-point. **(C)** Volcano plot showing differentially expressed genes between EARLY and LATE (blue: upregulated at LATE, red: upregulated at EARLY). The x axis represents log fold change and y axis represents $-\log_{10}$ adjusted p-values. **(D)** Heatmap of the top 369 differentially expressed genes between EARLY and LATE as defined in (C). **(E)** Violin plots of genes associated with exhaustion and inhibition (top panel; *Prdm1*, *Havcr2*, *Sla2*, *Sla*), IFN signalling (middle panel; *Ifi27*, *Ifi44l*, *Ifi6*, *Isg15*, *Ifitm1*) and stemness (bottom panel; *Gzmk*, *Il7r*, *Tcf7*, *Nell2*) of CD8 T cells. The violin represents the probability density at each value. Each dot represents one cell. Significativity was assessed using a Wilcoxon unpaired test. FDR-adjusted *P* values are reported (** *P* < 0.01, *** *P* < 0.001, **** *P* < 0.0001). **(F)** GSEA showing the enrichment of genes associated with IFN signature, co-inhibitory molecules, terminally exhausted signature, apoptosis and stabilization of p53 in EARLY cells and central memory signature in LATE cells. Normalized enrichment scores and adjusted *P* values are indicated.

SUPPLEMENTAL FIGURE 4 – Comparative analysis with HIV-2 specific CD8⁺ T cells.

(A) Representative staining of B*53-TL9 specific CD8⁺ T cells from a HIV-2 infected subject, showing comparable phenotype with HIV-1 specific CD8⁺ T cells from LATE time points. (B) Heatmap of the top 532 differentially expressed genes between EARLY and LATE HIV-1 specific CD8⁺ T cells from PS03 and HIV-2 specific CD8⁺ T cells from two HIV-2 controllers.

SUPPLEMENTAL FIGURE 5 - HIV epitope sequences

Viral sequences of the HIV-1 epitopes studied were determined at several time points. Viral sequences were compared with the reference HXB2, and mutations within the epitopes are highlighted in red.

SUPPLEMENTAL FIGURE 6 - Clonotypic analyses of HIV-1 specific CD8⁺ T cells.

TCRBV, TCRBJ, TRAV and TRAJ usages as well as TRB CDR3aa sequences and TRA CDR3aa sequences are showed for all detected clonotypes within B*08-FL8 (A), B*08-EI8 (B) and B*57-KF11 (C) specific CD8⁺ T cells in PS24 or PS03. Their frequency is indicated at each time-point. Clonotypes of interest (i.e. old and new) are highlighted using the same colour-code than in Figures 5A-C.

Table 1

Patient	Early	Int	Late	Sex	Year of birth	Age at EARLY	Age at LATE	Follow-up (years)	NADIR CD4 (cells/mm ³)	HLA-A	HLA-B	Epitope
PS01	11/1991	01/95	09/2016	M	1952	39	64	25	324	A*02	-	SL9
PS03	11/1991	11/1994	10/2016	M	1961	30	55	25	4	A*02	B*57	SL9, KF11, TW10
PS07	12/1991	02/1997	09/2016	M	1950	41	66	25	15			
PS14	01/1992	02/1997	08/2016	M	1953	39	63	24	180	A*03	B*35	QK10, RY10
PS17	03/1992	-	04/2017	M	1959	33	58	25	488*	A*02, A*03	-	SL9, QK10, RY10
PS18	02/1992	03/1997	10/2016	M	1959	33	57	24	79	-	-	
PS23	02/1992	04/1996	01/2017	F	1957	35	60	25	109	A*02	-	SL9
PS24	02/1992	02/1996	10/2016	F	1939	53	78	25	166	A*02	B*08	SL9, FL8, EI8
PS31	07/1992	09/1997	08/2016	M	1956	36	61	25	85	A*02	-	SL9
PS34	04/1993	04/1995	04/2017	M	1960	33	57	24	1			
PS111	03/1988	-	12/2016	M	1943	45	74	29	260	-	B*08, B*57	FL8, EI8, KF11, TW10
PS112	02/1988	05/1990	09/2016	M	1955	33	62	29	133	A*03	B*07	QK10, RY10, RL9, IL9
PS114	03/1991	-	09/2016	F	1962	29	54	25	18	A*02	B*57	SL9, KF11, TW10
PS208	12/1993	02/1997	10/2016	M	1958	35	58	23	102	-	-	
PS209	06/1991	01/1992	03/2017	M	1954	37	63	26	550	-	-	
PS212	01/1992	05/1997	08/2016	M	1951	41	66	25	163	A*02	-	SL9
PS222	04/1995	-	03/2017	M	1964	31	53	22	120			
PS228	09/1991	06/1994	12/2016	M	1938	53	78	25	8	-	-	
PS240	04/1991	-	10/2016	M	1955	36	62	26	136	-	-	
PS248	11/1991	05/1997	10/2016	M	1957	34	59	25	211	-	-	

* Only access to CD4 counts between 04/2009 and 09/2017

Figure 1

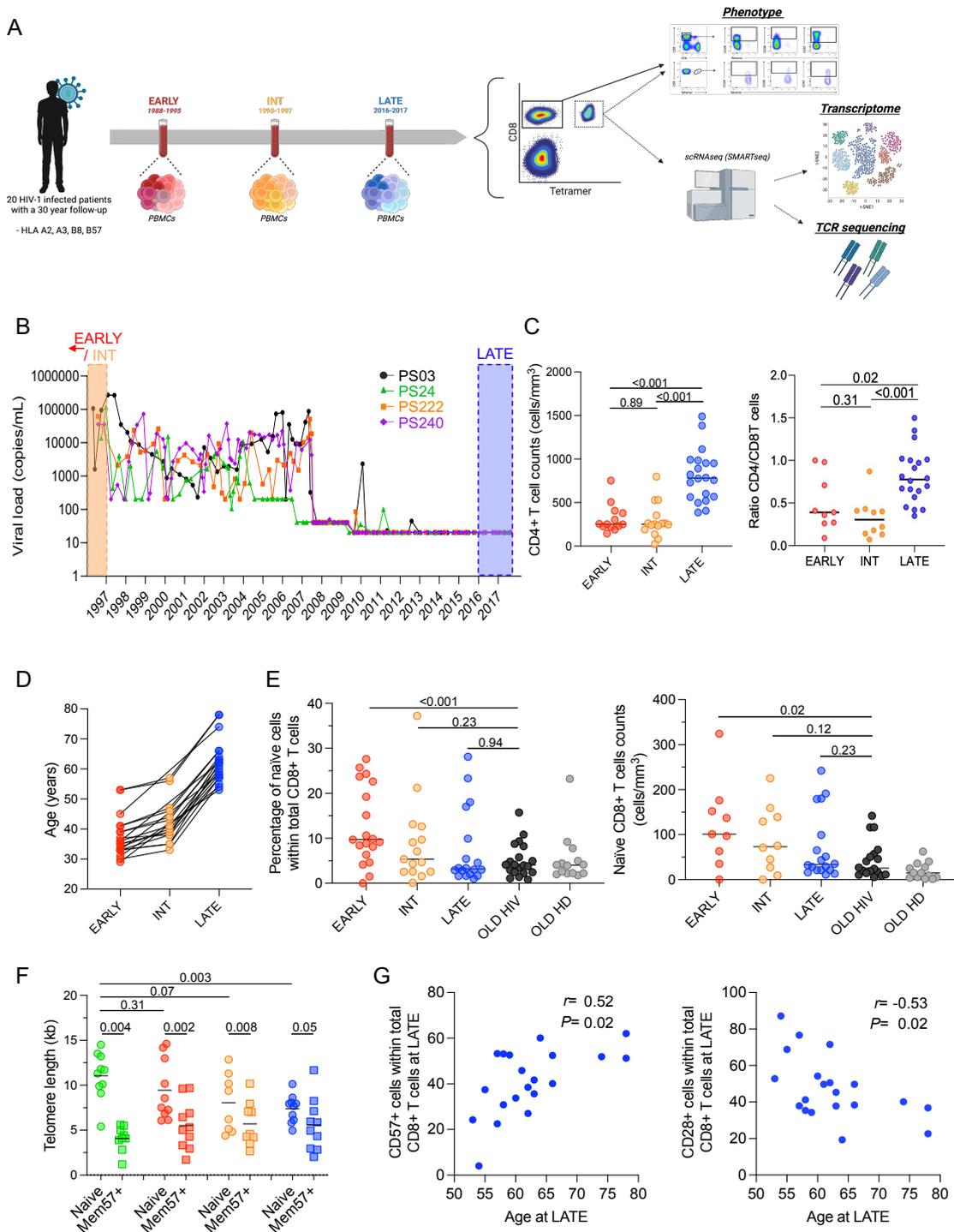


Figure 2

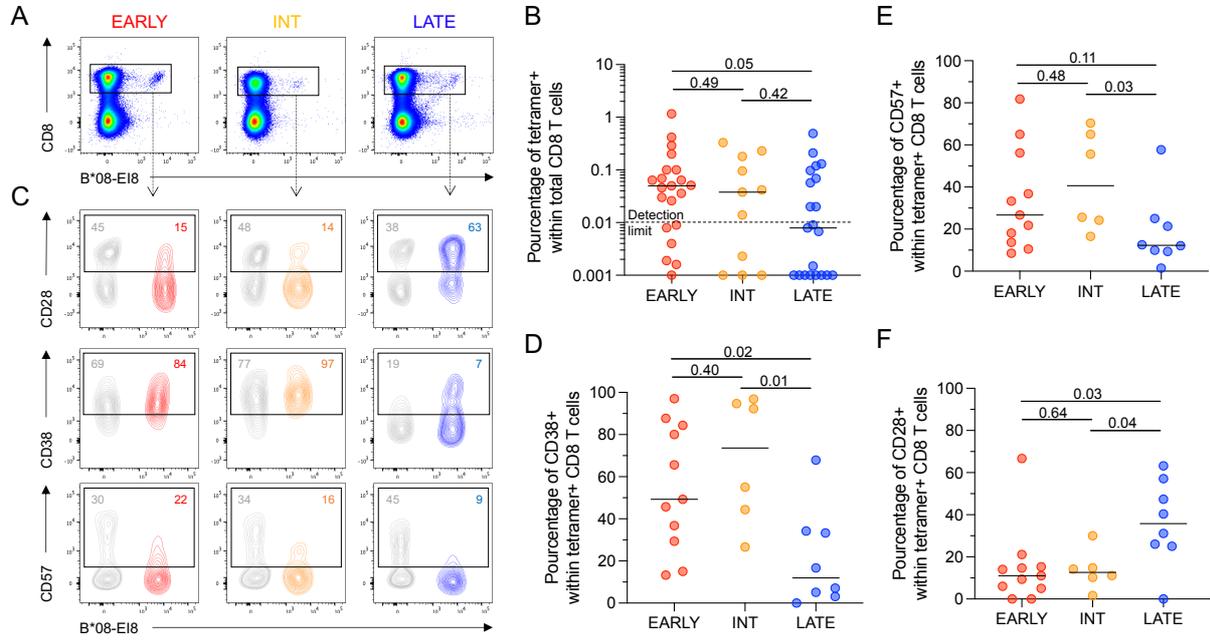


Figure 3

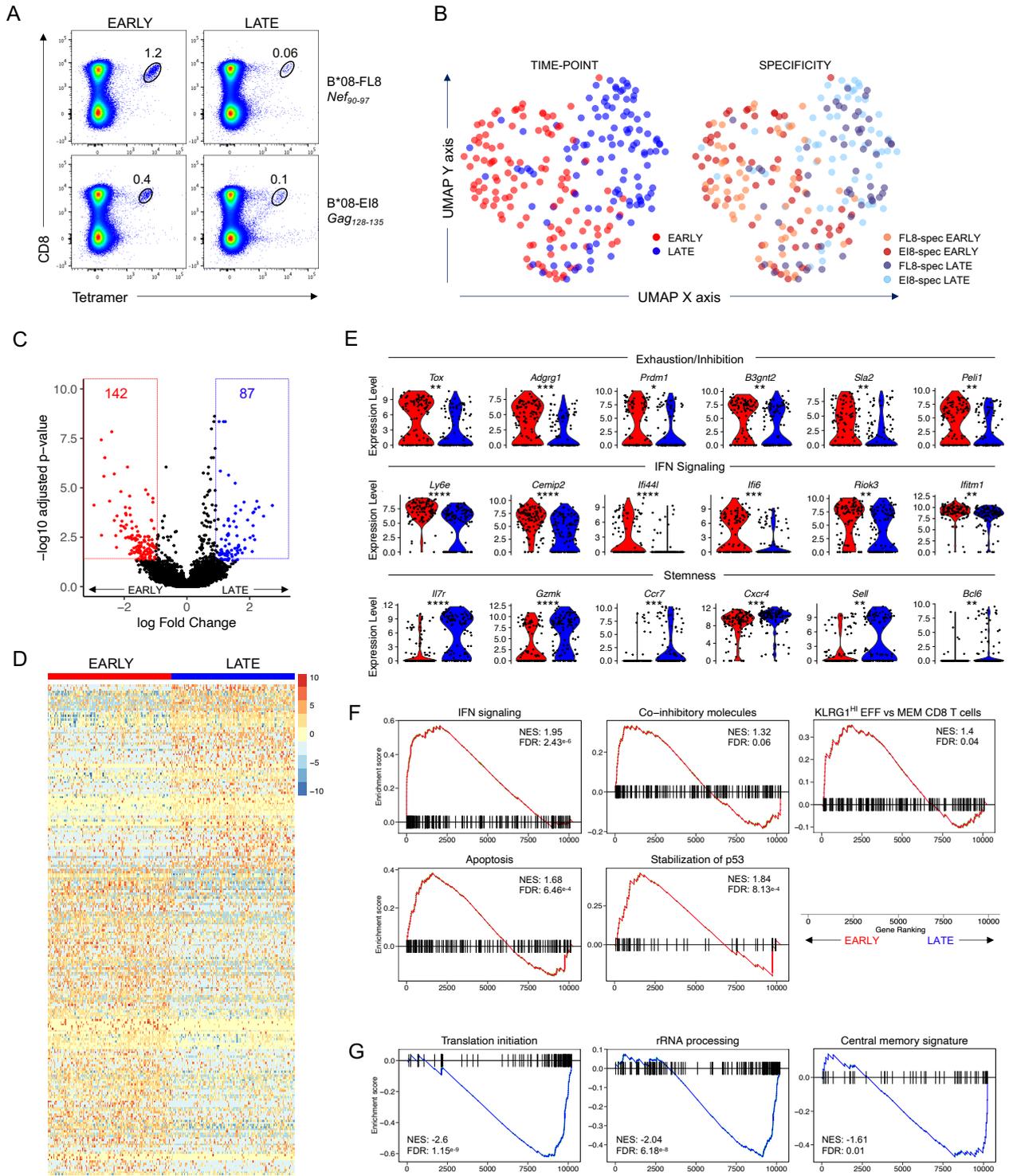


Figure 4

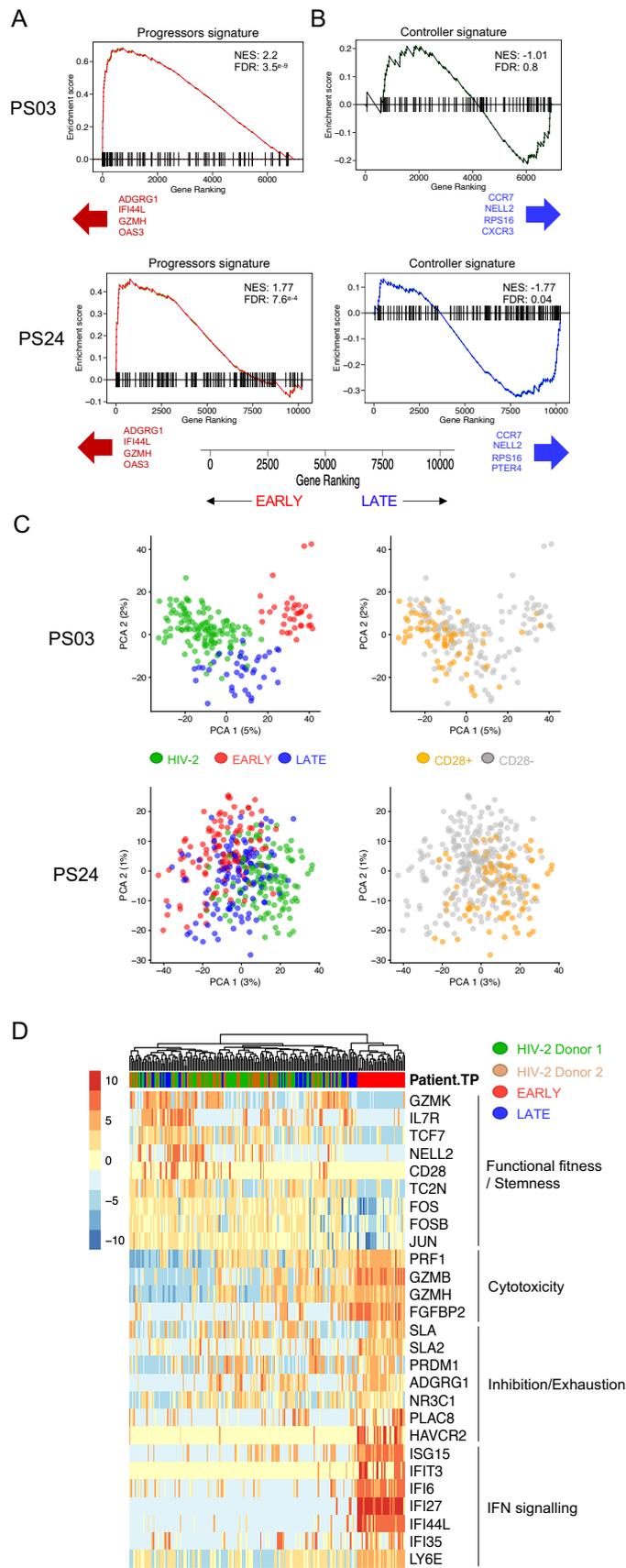


Figure 5

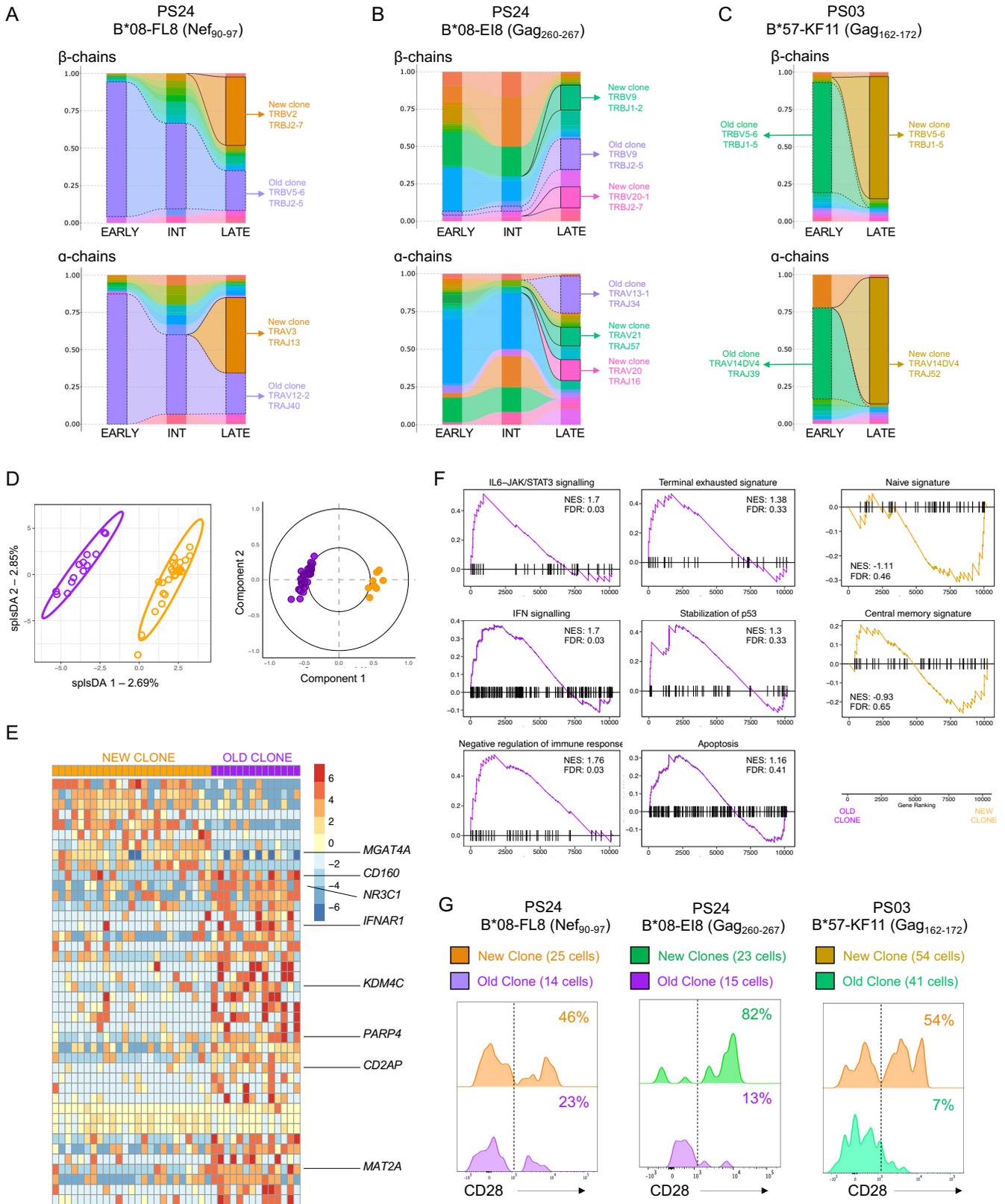


Figure S1 – Evolution of viral load and CD4 counts in HIV-1 infected patients from the Immunoco cohort

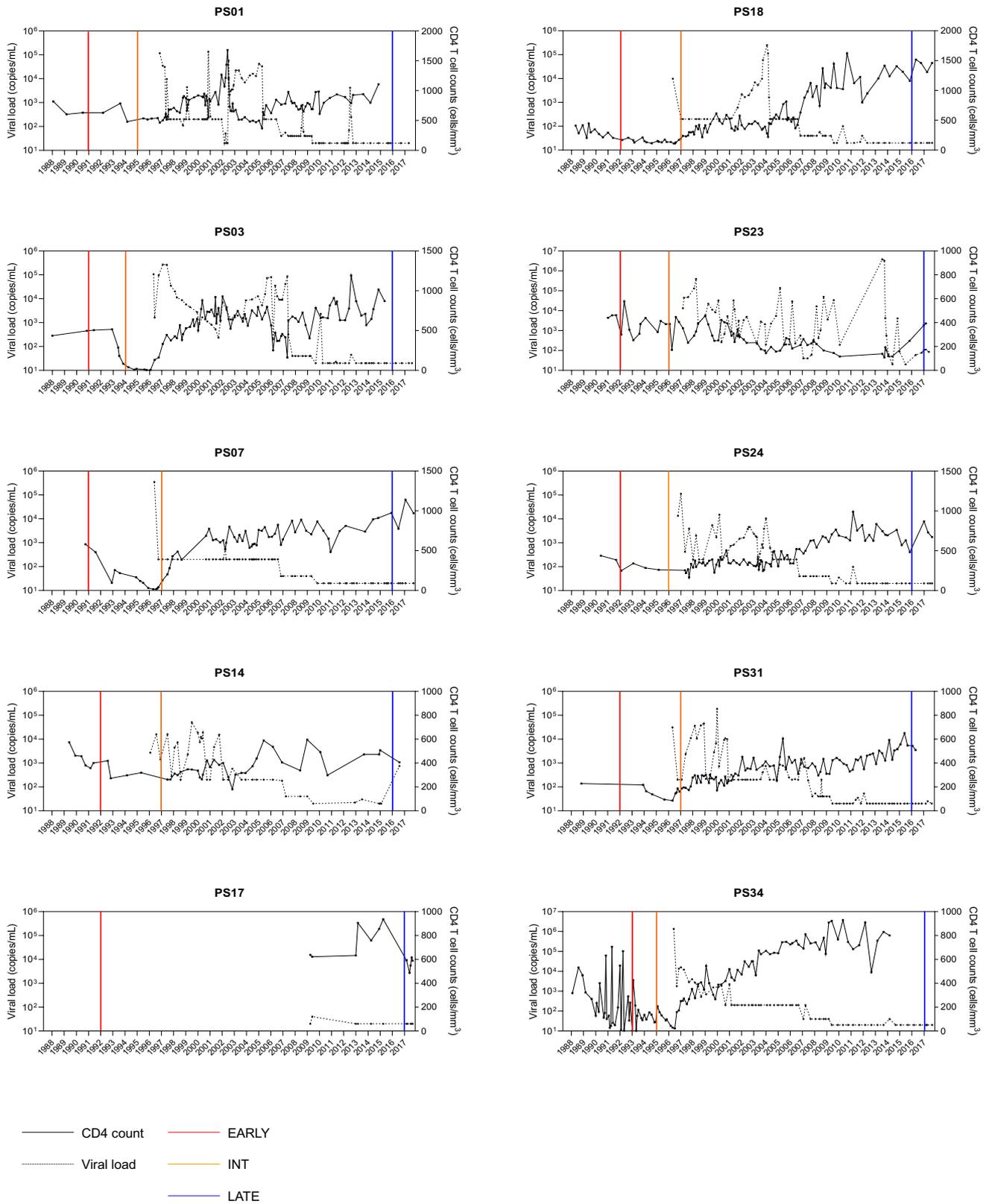


Figure S1 – Evolution of viral load and CD4 counts in HIV-1 infected patients from the Immunoco cohort

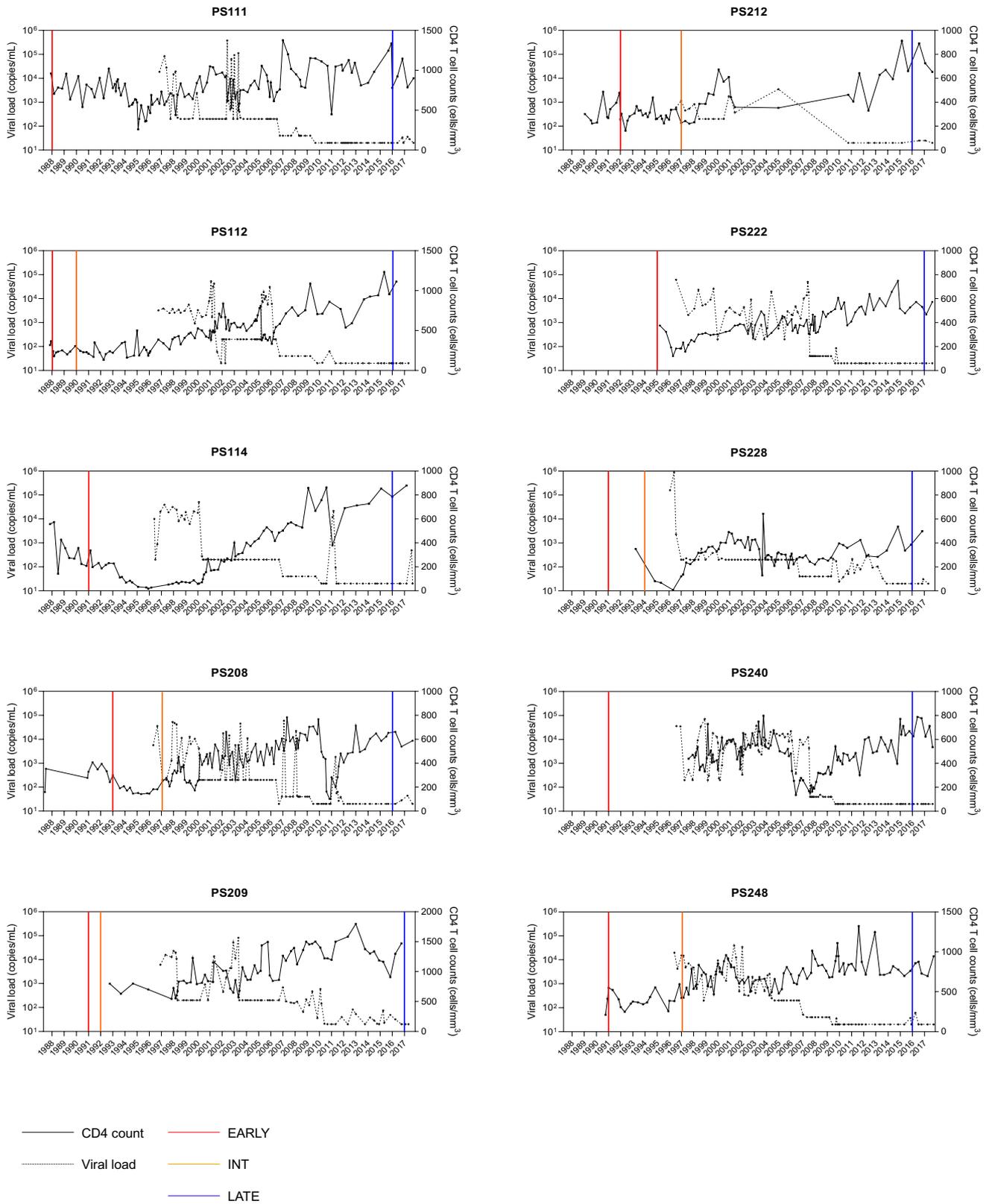


Figure S2 – Additional phenotypic markers of tetramer⁺ specific CD8 T cells

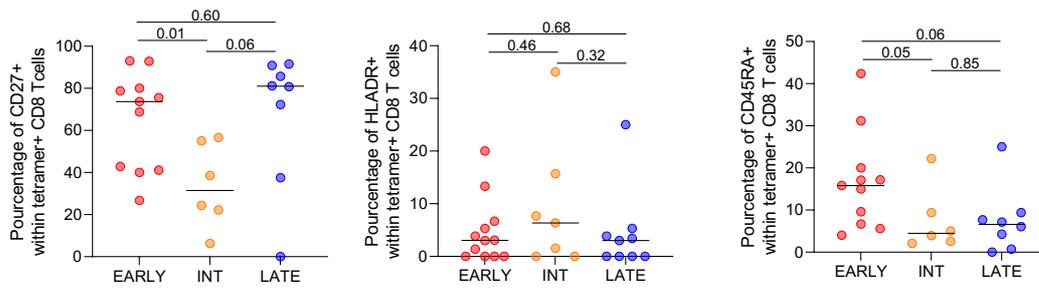


Figure S3 – Transcriptomic analysis of the KF11-specific response in PS03

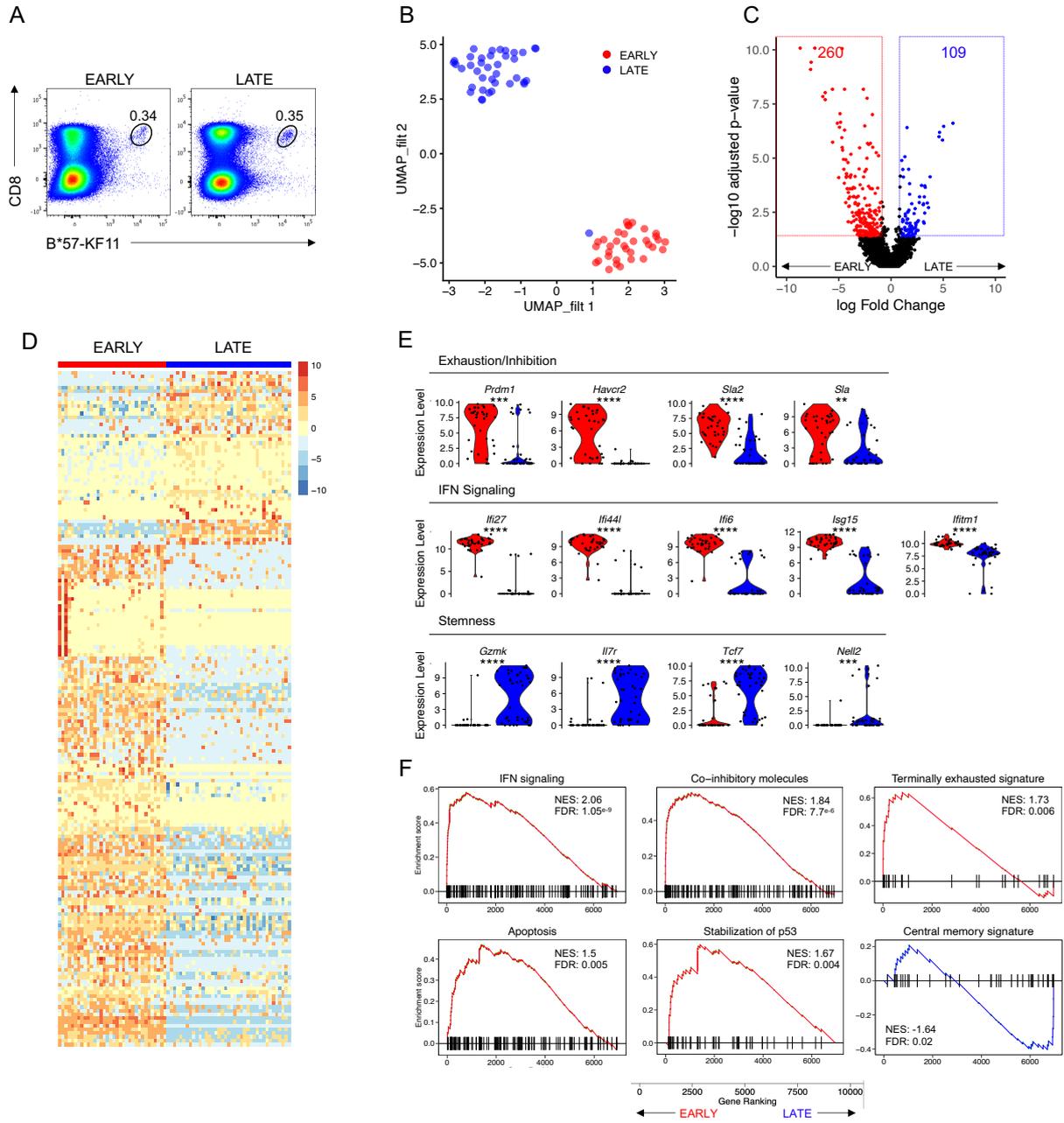


Figure S4 – Phenotypic and transcriptomic analyses of HIV-2 specific CD8 T cells

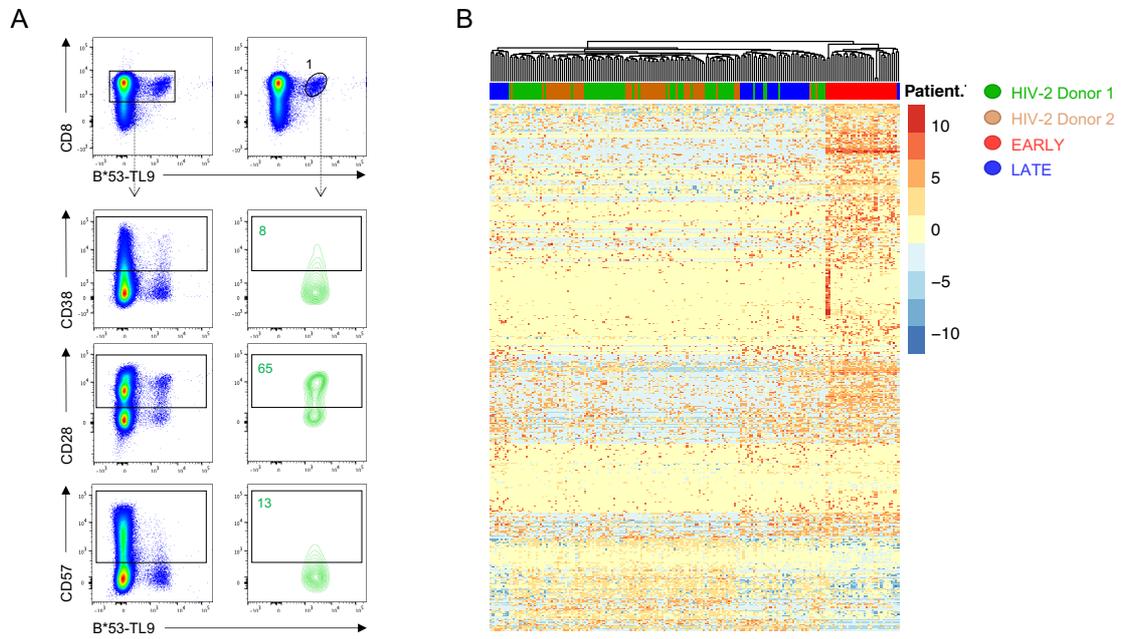


Figure S5 – Evolution of HIV epitopes

PS17			
Time-point	A*02-SL9 (Gag ₇₇₋₈₅)	A*03-RY10 (Gag ₂₀₋₂₉)	A*03-QK10 (Nef ₇₃₋₈₂)
HXB2	SLYNTVATL	RLRPGGKKKY	QVPLRPMTYK
1992 (EARLY)	-----	-----K-I- R-M-	-----
2013	-----	-----R-S-	-----
2016 (LATE)	-----	Q---E-Q-S-	-----

PS03		PS14	
Time-point	B*57-KF11 (Gag ₁₆₂₋₁₇₂)	Time-point	A*03-QK10 (Nef ₇₃₋₈₂)
HXB2	KAFSPEVIPMF	HXB2	QVPLRPMTYK
1991 (EARLY)	-----	1992 (EARLY)	-----F-
1994 (INT)	-----	2012	-----F-
2012	-----	2016 (LATE)	-----F-
2016 (LATE)	-----		

PS114		
Time-point	B*57-KF11 (Gag ₁₆₂₋₁₇₂)	B*57-TW10 (Gag ₂₄₀₋₂₄₉)
HXB2	KAFSPEVIPMF	TSTLQEQIGW
1991 (EARLY)	-----	--N-----Q-
2012	-----	--N-----Q-
2016 (LATE)	-----	--N-----Q-

PS24		
Time-point	B*08-EI8 (Gag ₂₆₀₋₂₆₇)	B*08-FL8 (Nef ₉₀₋₉₇)
HXB2	EIYKRWII	FLKEKGGL
1992 (EARLY)	-----	-----
1996 (INT)	-----	----M----
2012	-----	---K--- M
2016 (LATE)	-----	---K--- M

Figure S6A – Clonal analysis of HIV-specific CD8 T cells

PS24 B*08-FL8 (Nef₉₀₋₉₇)

	TRBV	CDR3.aa	TRBJ	Freq	TRAV	CDR3.aa	TRAJ	Freq
EARLY	TRBV5-6	CASSTGTGSAQETQYF	TRBJ2-5	90	TRAV12-2	CAVRGSGTYKYIF	TRAJ40	87,3
	TRBV7-8	CASSPIEGIVTEAFF	TRBJ1-1	1,43	TRAV1-2	CAVRDLGTYKYIF	TRAJ40	1,59
	TRBV15	CATSRGGLLNTGELFF	TRBJ2-2	1,43	TRDV2	CACDTLLRVNGDRRGADKLIF	TRDJ1	1,59
	TRBV3-1	CASSQERTTPYNEQFF	TRBJ2-1	1,43	TRAV19	CALSEETSNTGKLIF	TRAJ37	1,59
	TRBV9	CASSVGAGPYEQYF	TRBJ2-7	1,43	TRAV1-1	CARLNSATNKLIF	TRAJ32	1,59
	TRBV12-3	CASSVGGFYNEQFF	TRBJ2-1	1,43	TRAV19	CALSELGGSNYKLTFF	TRAJ53	1,59
	TRBV11-3	CASSPLGEVETGELFF	TRBJ2-2	1,43	TRAV19	CALSESQDNDMRF	TRAJ43	1,59
	TRBV28	CASSGLGGGDTQYF	TRBJ2-3	1,43	TRAV25	CAGYTNAGKSTF	TRAJ27	1,59
				TRAV27	CAGARNSGGSNYKLTFF	TRAJ53	1,59	
INT	TRBV5-6	CASSTGTGSAQETQYF	TRBJ2-5	57,14	TRAV12-2	CAVRGSGTYKYIF	TRAJ40	53,33
	TRBV14	CASSQDRGAGANVLTFF	TRBJ2-6	4,76	TRAV5	CAPSGNYGGSQGNLIF	TRAJ42	6,67
	TRBV27	CASSLGGQGAFYEQYF	TRBJ2-7	4,76	TRAV3	CAVRDDWDFGNEKLTF	TRAJ48	6,67
	TRBV7-2	CASSPFGSGELFF	TRBJ2-2	4,76	TRAV12-1	CVVKNKDMRF	TRAJ43	6,67
	TRBV5-6	CASSLKDSYEQYF	TRBJ2-7	4,76	TRAV9-2	CALESLYNNNDMRF	TRAJ43	6,67
	TRBV7-9	CASSPPTGSYEQYF	TRBJ2-7	4,76	TRAV1-1	CAASSTGKLIF	TRAJ37	6,67
	TRBV7-3	CASSFAGGADTQYF	TRBJ2-3	4,76	TRAV6	CALPLWDTGFQKLVF	TRAJ8	6,67
	TRBV27	CASSPRDTRAEAFF	TRBJ1-1	4,76	TRAV8-3	CAVDNFNKIFYF	TRAJ21	6,67
	TRBV27	CASSTSGASNEKLFF	TRBJ1-4	4,76				
	TRBV30	CAWSPLSGGSNTEAFF	TRBJ1-1	4,76				
LATE	TRBV2	CASSEFGAAVYEQYF	TRBJ2-7	45,78	TRAV3	CAVREAGGYQKVTF	TRAJ13	50,68
	TRBV5-6	CASSTGTGSAQETQYF	TRBJ2-5	26,51	TRAV12-2	CAVRGSGTYKYIF	TRAJ40	27,4
	TRBV7-9	CASSPPTGSYEQYF	TRBJ2-7	4,82	TRAV12-1	CVSYNTNAGKSTF	TRAJ27	2,74
	TRBV20-1	CSARDSVTGGGYSPLHF	TRBJ1-6	3,61	TRAV13-1	CAAKTSGTYKYIF	TRAJ40	2,74
	TRBV7-8	CASSPIEGIVTEAFF	TRBJ1-1	2,41	TRAV8-3	CAVDNFNKIFYF	TRAJ21	2,74
	TRBV11-2	CASSLGGWGTGYEQYF	TRBJ2-7	2,41	TRAV12-2	CAVRRAGTYKYIF	TRAJ40	2,74
	TRBV15	CATSRGGGLTNTGELFF	TRBJ2-2	2,41	TRAV3	CAVRDNQRANQFYF	TRAJ49	1,37
	TRBV7-3	CASSSTGGGTEAFF	TRBJ1-1	1,2	TRAV17	CATDFFGNEKLTF	TRAJ48	1,37
	TRBV15	CATSRGTVSYEQYF	TRBJ2-7	1,2	TRAV19	CALSSYDMRF	TRAJ43	1,37
	TRBV7-2	CASSADSYNEQFF	TRBJ2-1	1,2	TRAV5	CAESICA_SASKIIF	TRAJ3	1,37
	TRBV2	CASSPSGGPDNEQFF	TRBJ2-1	1,2	TRAV19	CALTGTGAGSARQLTF	TRAJ22	1,37
	TRBV6-3	CASSFDPPGQGDPPFSNQPHF	TRBJ1-5	1,2	TRAV16	CALRRGSNYKLTFF	TRAJ53	1,37
	TRBV4-3	CASSQGPPLRDEQFF	TRBJ2-1	1,2	TRAV24	CARNQFYF	TRAJ49	1,37
	TRBV5-1	CASSSGGAGREQFF	TRBJ2-1	1,2	TRAV4	CLVSRARLMF	TRAJ31	1,37
	TRBV12-3	CASQGETQYF	TRBJ2-5	1,2				
	TRBV29-1	CSVEDGRGPDTEAFF	TRBJ1-1	1,2				
	TRBV6-5	CASSLRQGERSPLHF	TRBJ1-6	1,2				

Figure S6B – Clonal analysis of HIV-specific CD8 T cells

PS24 B*08-EI8 (Gag₂₆₀₋₂₆₇)

	TRBV	CDR3.aa	TRBJ	Freq	TRAV	CDR3.aa	TRAJ	Freq
EARLY	TRBV2	CASSTGTSGRGEQFF	TRBJ2-1	29,33	TRAV8-3	CAVGYTDKLIFF	TRAJ34	42,42
	TRBV5-1	CASSLYPGGNEQYF	TRBJ2-7	22,67	TRAV8-6	CAVGYTDKLIFF	TRAJ34	42,42
	TRBV7-8	CASSFQGERTEAFF	TRBJ1-1	10,67	TRAV1-1	CAVSSGNTPLVF	TRAJ29	16,67
	TRBV2	CASSEAAATGRSTDTQYF	TRBJ2-3	10,67	TRAV25	CAGPGGGGANNLFF	TRAJ36	6,06
	TRBV2	CASSAAVKGDTQYF	TRBJ2-3	9,33	TRAV1-2	CAVRGGIW_SARQLTF	TRAJ22	4,55
	TRBV7-9	CASSLEPPGYASDEQFF	TRBJ2-1	2,67	TRAV22	CAPTRP_NQFYF	TRAJ49	4,55
	TRBV6-1	CASSELDGMRDTQYF	TRBJ2-3	2,67	TRAV13-1	CAAPGGGGNKLTF	TRAJ10	3,03
	TRBV9	CASSVVGDSRETQYF	TRBJ2-5	2,67	TRAV13-1	CAASNGYSTLTF	TRAJ11	3,03
	TRBV7-8	CASSPLDGKRDQYF	TRBJ2-3	1,33	TRAV8-6	CAVSDHNDMRF	TRAJ43	3,03
	TRBV27	CASSLDRDRGLRAGELFF	TRBJ2-2	1,33	TRDV2	CACDAIYGGSDTDKLIFF	TRDJ1	1,52
	TRBV20-1	CSARLSYEQYF	TRBJ2-7	1,33	TRAV21	CAVICLR_GSEKLVF	TRAJ57	1,52
	TRBV20-1	CSARDGSRQAASEKLF	TRBJ1-4	1,33	TRAV30	CGTDSNTGNQFYF	TRAJ49	1,52
	TRBV28	CASSLSQYNSPLHF	TRBJ1-6	1,33	TRDV2	CACDTVLGGYDPLTDKLIFF	TRDJ1	1,52
	TRBV9	CASSVVGGRDQYF	TRBJ2-3	1,33	TRAV38-1	CAFISNTDKLIFF	TRAJ34	1,52
	TRBV7-6	CASSLAGPPNEQFF	TRBJ2-1	1,33	TRAV12-2	CAGPAYSGAGSYQLTF	TRAJ28	1,52
					TRAV21	CAVDTDKLIFF	TRAJ34	1,52
				TRAV12-3	CAIVKAAGNKLTF	TRAJ17	1,52	
				TRAV13-1	CAATTSYDKVIF	TRAJ50	1,52	
				TRAV27	CAGSSSNTGKLIFF	TRAJ37	1,52	
				TRAV19	CALSERGNQFYF	TRAJ49	1,52	
INT	TRBV2	CASSEAAATGRSTDTQYF	TRBJ2-3	33,33	TRAV8-6	CAVGYTDKLIFF	TRAJ34	37,5
	TRBV5-1	CASSLYPGGNEQYF	TRBJ2-7	20	TRAV8-3	CAVGYTDKLIFF	TRAJ34	37,5
	TRBV2	CASSAAVKGDTQYF	TRBJ2-3	16,67	TRAV8-6	CAVSDHNDMRF	TRAJ43	20,83
	TRBV2	CASSTGTSGRGEQFF	TRBJ2-1	13,33	TRAV1-1	CAVSSGNTPLVF	TRAJ29	16,67
	TRBV7-2	CASSQGLADGTGELFF	TRBJ2-2	3,33	TRAV13-1	CAAPGGGGNKLTF	TRAJ10	4,17
	TRBV9	CASSVVGDSRETQYF	TRBJ2-5	3,33	TRAV20	CAGGGGAQKLVF	TRAJ54	4,17
	TRBV20-1	CSARLSYEQYF	TRBJ2-7	3,33	TRAV4	CLVGPISGARSARQLTF	TRAJ22	4,17
	TRBV9	CASSVEVNTTEAFF	TRBJ1-1	3,33	TRAV30	CGTDSNTGNQFYF	TRAJ49	4,17
	TRBV30	CAWKPPD_GQETQYF	TRBJ2-5	3,33	TRAV16	CALNDNTDKLIFF	TRAJ34	4,17
				TRAV20	CAVRQTGANLFF	TRAJ36	4,17	
LATE	TRBV9	CASSVVGDSRETQYF	TRBJ2-5	20,51	TRAV13-1	CAASMADKLIFF	TRAJ34	24,62
	TRBV9	CASSPLPSLYGYTF	TRBJ1-2	16,67	TRAV21	CAHGGGGSEKLVF	TRAJ57	12,31
	TRBV20-1	CSAREGGYEQYF	TRBJ2-7	14,1	TRAV20	CAPSDGQKLIFF	TRAJ16	13,85
	TRBV5-1	CASTPQGARGDTEAFF	TRBJ1-1	10,26	TRAV12-1	CVVEAGGTSYGKLIFF	TRAJ52	10,77
	TRBV7-9	CASSPPTGSYEQYF	TRBJ2-7	10,26	TRAV8-3	CAVDNFNKFIFF	TRAJ21	6,15
	TRBV20-1	CSARRDYEQYF	TRBJ2-7	3,85	TRAV20	CAPGDGQKLIFF	TRAJ16	6,15
	TRBV10-2	CASSETGGRGTEAFF	TRBJ1-1	2,56	TRAV21	CAVSPRGYKLSF	TRAJ20	1,54
	TRBV20-1	CSARQSYEQYF	TRBJ2-7	2,56	TRAV13-1	CAGNYGGSQGNLIFF	TRAJ42	1,54
	TRBV7-8	CASSFQGSNQPHF	TRBJ1-5	1,28	TRAV3	CAVRDNQRANQFYF	TRAJ49	1,54
	TRBV4-3	CASSQDRPGRDEQYF	TRBJ2-7	1,28	TRAV38-2DV8	CAYVRGGADGLTF	TRAJ45	1,54
	TRBV4-1	CASSQPGGGLSYNEQFF	TRBJ2-1	1,28	TRAV24	CACSNQAGTALIF	TRAJ15	1,54
	TRBV12-3	CASSLVHEQYF	TRBJ2-7	1,28	TRAV38-2DV8	CAYRPSGSRLTF	TRAJ58	1,54
	TRBV2	CASSPSGGPDNEQFF	TRBJ2-1	1,28	TRDV2	CACDTLLPTGDTLFDKLIFF	TRDJ1	1,54
	TRBV5-6	CASSFSATDQYF	TRBJ2-3	1,28	TRAV25	CAAPSSGDYKLSF	TRAJ20	1,54
	TRBV4-1	CASSVQVFEDRGYGYTF	TRBJ1-2	1,28	TRAV2	CAVTAML_NNRKLIW	TRAJ38	1,54
	TRBV4-3	CASSQEDQGMGETQYF	TRBJ2-5	1,28	TRAV41	CAVRGEWGSNYKLIFF	TRAJ53	1,54
	TRBV9	CASSVPIGTGSYNEQFF	TRBJ2-1	1,28	TRAV27	CAGHYPNQYKLSF	TRAJ20	1,54
	TRBV7-3	CSGRD_GELFF	TRBJ2-2	1,28	TRAV19	CALSETDTGNQFYF	TRAJ49	1,54
	TRBV19	CASSTSGSSYNEQFF	TRBJ2-1	1,28	TRAV13-2	CAENGVLLDTRRRALTF	TRAJ5	1,54
	TRBV6-2	CASRRRDYEQYF	TRBJ2-7	1,28	TRAV20	CAVRQQGKLIFF	TRAJ23	1,54
	TRBV20-1	CSARLSYEQYF	TRBJ2-7	1,28	TRAV4	CLVGPQQGKLIFF	TRAJ23	1,54
	TRBV11-3	CASSLEAS_VDTEAFF	TRBJ1-1	1,28	TRAV19	CALSEETSNTGKLIFF	TRAJ37	1,54
	TRBV9	CASSVVAAGTDQYF	TRBJ2-3	1,28	TRAV13-1	CAASRSR_TYKIYIF	TRAJ40	1,54

Figure S6C – Clonal analysis of HIV-specific CD8 T cells

PS03 B*57-KF11 (Gag₁₆₂₋₁₇₂)

	TRBV	CDR3.aa	TRBJ	Freq	TRAV	CDR3.aa	TRAJ	Freq
EARLY	TRBV5-6	CASSLSSNQPHF	TRBJ1-5	73,68	TRAV14DV4	CAMRSPPGNMLTF	TRAJ39	61,11
	TRBV20-1	CSAHWRTGARRETQYF	TRBJ2-5	1,75	TRAV16	CALIPKTGAGSYQLTF	TRAJ28	22,22
	TRBV4-1	CASSPRQGTYEQYF	TRBJ2-7	1,75	TRAV21	CAVSGGSYIPTF	TRAJ6	2,78
	TRBV6-5	CASSYEGNSPEAFF	TRBJ1-1	1,75	TRDV3	CASLHSRTGVGSPDKLIF	TRDJ1	2,78
	TRBV4-2	CASSQDSGGQGAFTGELFF	TRBJ2-2	1,75	TRAV12-1	CVVNNARLMF	TRAJ31	2,78
	TRBV4-1	CASSQEPYGTSNTEAFF	TRBJ1-1	1,75	TRAV21	CAVSSSGSASKIIF	TRAJ3	2,78
	TRBV15	CATSRARTGGYYEQYF	TRBJ2-7	1,75	TRAV22	CAVRPGFNKFYF	TRAJ21	2,78
	TRBV12-3	CASSFSDRAETQYF	TRBJ2-5	1,75	TRAV17	CATGGLDQGGYEKLVF	TRAJ57	2,78
	TRBV6-5	CASTSQGGGYNEQFF	TRBJ2-1	1,75				
	TRBV4-1	CASSQEAGAGSPYGYTF	TRBJ1-2	1,75				
	TRBV5-1	CASIASYRFRWGTNPANTGELFF	TRBJ2-2	1,75				
	TRBV7-6	CASSLQLAGGQETQYF	TRBJ2-5	1,75				
	TRBV20-1	CSAVDREKDYGYTF	TRBJ1-2	1,75				
	TRBV7-6	CASSLELAGGRETQYF	TRBJ2-5	1,75				
	TRBV7-3	CASSPSTSAYNEQFF	TRBJ2-1	1,75				
	TRBV6-2	CATMRLAGGNEQFF	TRBJ2-1	1,75				
	LATE	TRBV5-6	CASSLAGDLQPQHF	TRBJ1-5	81,82	TRAV14DV4	CAMRAGGTSYGKLTf	TRAJ52
TRBV7-3		CASSLSGSGVNEQFF	TRBJ2-1	1,52	TRAV12-1	CVVTLSGTYKYIF	TRAJ40	1,92
TRBV6-3		CASSLGYGYTF	TRBJ1-2	1,52	TRAV1-2	CAVSPSTGGFKTIF	TRAJ9	1,92
TRBV6-3		CASSYVAGEGNQPQHF	TRBJ1-5	1,52	TRAV12-1	CVVEDNYGQNFVF	TRAJ26	1,92
TRBV30		CAWSTLQGTLEQYF	TRBJ2-7	1,52	TRAV12-1	CVPYNYGQNFVF	TRAJ26	1,92
TRBV2		CASSGEGQETQYF	TRBJ2-5	1,52	TRAV14DV4	CAMRPINTGTASKLTF	TRAJ44	1,92
TRBV7-3		CASSLSLAGNEQFF	TRBJ2-1	1,52	TRAV27	CAGEDRDDKIIF	TRAJ30	1,92
TRBV10-2		CARRDPGGQVTEAFF	TRBJ1-1	1,52	TRAV26-1	CIVRVPYDKIIF	TRAJ30	1,92
TRBV15		CATSSGLGQGGQYF	TRBJ2-7	1,52	TRAV38-2DV8	CAYRREDPGTASKLTF	TRAJ44	1,92
TRBV30		CAWSADNRGLAFF	TRBJ1-1	1,52				
TRBV27		CASSLGGARYEQYF	TRBJ2-7	1,52				
TRBV6-5		CASSRTGTGSYEQYF	TRBJ2-7	1,52				
TRBV6-2		CASSYRSGSGANVLTf	TRBJ2-6	1,52				

RÉSUMÉ

OBJECTIFS

Les lymphocytes T (LT) CD8 sont cruciaux pour le contrôle de l'infection à VIH-1. Certaines approches thérapeutiques comme la stratégie « shock and kill » visant à éradiquer le réservoir latent utilisent la capacité de LT CD8 à détruire spécifiquement les cellules infectées. Pour réussir, il est primordial de progresser dans notre compréhension de la réponse LT CD8 après des années de traitement. Pour y parvenir nous proposons d'étudier l'évolution de la réponse LT CD8 spécifique du virus dans une cohorte unique d'individus infectés par VIH-1 et traités par antirétroviraux avec un suivi de plus de 25 ans de l'infection. Notre but est de caractériser le répertoire LT CD8 et son potentiel pour contrôler la réplication virale tout en séquençant le virus sur les épitopes reconnus par les LT CD8.

METHODES

Les LT CD8 spécifiques du VIH-1 de 11 patients ont été caractérisés par cytométrie en flux pour évaluer leurs niveaux d'activation, de différenciation et de sénescence au cours du suivi. La méthode du single cell RNA sequencing (scRNAseq) a été appliquée sur 4 patients de la cohorte pour évaluer leur propriété fonctionnelle et composition clonotypique (via le séquençage des chaînes alpha et beta du TCR). En parallèle nous avons évalué la capacité de ces cellules spécifiques de VIH de patients traités à proliférer et produire des molécules cytolytiques après stimulation *in vitro* avec des peptides viraux, et l'impact d'adjuvants présélectionnés (ligands de TLR ou STING notamment).

RESULTATS

Après des années d'infections, les LT CD8 spécifiques du VIH montrent une expression réduite de CD38 et CD57 ainsi qu'une expression accrue de CD28, indicateur d'un profil moins activé, moins sénéscent et moins différencié. De plus, les cellules LT CD8 spécifiques du virus de deux individus traités à long terme montrent un profil d'expression génique associé à des marqueurs de différenciation précoces (*Il7r*, *Tcf7*, *Gzmk*, *Sell*, *Ccr7*). Ce profil rappelle les LT CD8 de patients infectés par VIH-2, connus pour être capable de générer des réponses LT CD8 robustes face à l'infection. Ces changements phénotypiques et transcriptomiques sont associés à l'apparition de nouveaux clonotypes avec un potentiel pour le contrôle de la réplication virale. Enfin, nous montrons que des LT CD8 spécifiques du virus hautement fonctionnels peuvent être générés avec des ligands spécifiques, même après des années de traitement.

CONCLUSION

Nos résultats indiquent que les LT CD8 spécifiques du virus maintiennent un potentiel pour le contrôle de la réplication virale. Ces résultats sont encourageants pour soutenir le rationnel de la stratégie « shock and kill » et éventuellement à terme, permettre la guérison fonctionnelle de l'infection.